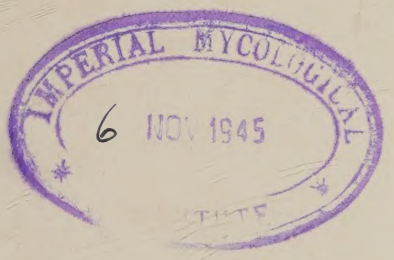
АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XIV. ВЫП. 2



ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1945

ЗООЛОГО-ЗООТОМИЧЕСКОГО МУЗЕЯ

МИКРОБИОЛОГИЯ

Ответственный редактор чл.-корр. Академии Наук СССР Б. Л. Исаченко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

А. Ф. Войткевич, А. А. Имшенецкий,
Я. И. Раутенштейн, В. Л. Рыжков, В. О. Таусон,
Ф. М. Чистяков, В. Н. Шапошников

MICROBIOLOGY

EDITORIAL BOARD:

A. F. Woitkewich, A. A. Imšenecki,
B. L. Issatchenko (Editor), J. I. Rautenstein,
V. L. Rischkow, W. O. Tausson, F. M. Tchistiakov,
W. N. Schaposchnikov

Адрес редакции: Москва, 71, Б. Калужская, 33.
Институт микробиологии Академии Наук СССР

О ЯДЕРНОМ АППАРАТЕ БАКТЕРИЙ

А. А. Имшенецкий

Начиная с 1932 г. мною проводились исследования по цитологии бактерий, результаты которых были опубликованы в монографии, изданной в 1940 г.[1]. Эти исследования были посвящены главным образом ядерному аппарату у бактерий, и на основании своих данных я пришел к выводу, что представители Eubacteriales не имеют обособленного ядра и хроматин распределен у них в клетке диффузно.

В последние годы появились работы, в которых описывались обособленные хроматиновые тельца у бактерий, обозначаемые как ядра, нуклеоиды или хромозомы. Это обстоятельство побудило меня продолжить изучение строения бактерий и проверить данные, опубликованные в этих работах. Результаты этих исследований и составляют содержание данной статьи. Прежде чем перейти к ним, необходимо остановиться на нашем представлении о диффузном ядре у бактерий.

Выяснению вопроса о ядре у бактерий в значительной мере способствовали биохимические исследования, посвященные составу бактериальной клетки. Уже давно было известно, что бактерии содержат много нуклеопротеидов, и в этом заключается одна из причин их способности интенсивно окрашиваться. Однако только после того, как было окончательно установлено, что единственным специфическим компонентом ядерной субстанции как у животных, так и у растений является тимонуклеиновая кислота, открылись новые возможности. Применив разработанную нами колориметрическую методику и обрабатывая определенные навески бактериальных клеток в пробирках по Feulgen, мы установили, что 23 вида бактерий, относящихся к самым различным систематическим группам, постоянно содержат тимонуклеиновую кислоту [4]. Сравнительные исследования над водорослями, грибами и высшими растениями выяснили, что бактерии содержат значительно больше тимонуклеиновой кислоты, чем высшие и другие низшие растения. В дальнейшем эти данные были подтверждены и дополнены прекрасными исследованиями Белозерского [1, 2], применившего метод биохимического анализа, включающего в себя идентификацию нуклеиновых кислот. При этом оказалось, что бактерии содержат 8% тимонуклеиновой кислоты. Если мы примем (как обычно считают) ее содержание в хроматине равным 20%, то, следовательно, бактериальная клетка на 40% состоит из ядерного вещества. Эти биохимические анализы явились ценной предпосылкой для цитологических исследований. Стало очевидным, что ни о каких мелких ядрах, недоступных для изучения, не может быть и речи. Если бы все это ядерное вещество было сконцентрировано в одном месте, то в клетке имелась бы структура, занимающая около половины клетки и видимая при сравнительно небольших увеличениях. Однако цитологический анализ не позволяет обнаружить эти структуры, и хроматин у различных бактерий распределен в клетке диффузно. Теория диффузного ядра была наиболее отчетливо сформулирована в начале этого столетия Guilliermond,

[1] В списке литературы в конце статьи помещены работы, не вошедшие в список литературы монографии «Строение бактерий». Москва, 1940.

Printed in Soviet Union

а затем эту концепцию подтвердили другие исследователи (Dufrénoy, Pietschmann и Rippel, Schaede [15], Knaysi и Mudd [8]). В новейшее время отсутствие обособленных хроматиновых структур было установлено у спирилл (King [7], Lewis [9] и у взрослых клеток Bac. mycoides (Robinow [14]).

Существенно, что диффузное распределение хроматина в клетке не является стабильным. Ядерное вещество обладает способностью отмешиваться от цитоплазмы и давать внутри клетки обособленные структуры. Это явление будет рассмотрено ниже.

В теоретическом отношении значительный интерес представляет вопрос о той связи, которая существует в бактериальной клетке между нуклеопротеидами и цитоплазмой. Находятся ли они в виде мелких авизуальных частиц, равномерно распределенных по бактериальной клетке, или эта связь более тесная и носит химический характер? Нужно полагать, что тимонуклеиновая кислота находится в цитоплазме в низкомолекулярном состоянии и явление отмешивания хроматина связано с переходом кислоты в высокомолекулярную форму. Однако характеристика диффузного ядра с физико-химической точки зрения — задача будущих исследований.

Отсутствие видимых хромозом в бактериальной клетке, конечно, не решает вопроса о существовании в клетке цепочки генов. Отрицать ее присутствие так же невозможно, как отрицать существование диффузного ядра только на том основании, что цепочка генов не может быть в диффузном состоянии. Можно предполагать, что у бактерий содержится невидимая цепочка генов, а инертный хроматин, содержащийся в клетке в большом количестве, не образует вокруг этой цепочки футляра. Но такая гипотеза выходит за пределы наших экспериментальных возможностей, а изучение невидимых ядер является скорее предметом изучения биофизики, чем морфологии. В цитологических исследованиях метод аналогий мало убедителен. Гораздо продуктивнее сравнительный метод, который позволяет подойти к строению одноклеточных существ, учитывая их эволюцию.

Методика

Исследования были проведены главным образом с теми видами бактерий, у которых в последнее время описывались индивидуализированные ядра. Это были культуры B. coli, Proteus vulgarus, B. prodigiosum, а из видов, образующих споры, Bac. mycoides, Bac. mesentericus и Bac. subtilis.

Бактерии культивировались на мясопептонном бульоне и мясопептонном агаре. Параллельно с изучением фиксированных и окрашенных препаратов производилась микроскопия живых неокрашенных клеток. Фиксация препаратов на покровных стеклах производилась парами ледяной уксусной кислоты или формалина, а также фиксатором Карнуа. Параллельно часть препаратов высушивалась при 60°, и материал окрашивался без предварительной фиксации. При выборе методов окраски мы остановились на наиболее простых, так как они всегда позволяют обнаружить хроматиновые структуры, если они имеются в клетке. На основании многолетнего изучения цитологии бактерий мы убедились в том, что прибегать к специальным сложным окраскам и к различным модификациям дифференцировки препаратов нет надобности. Окраска препаратов производилась водными растворами метиленовой синьки или фуксина и железным гематоксилином по Heidenhain. Производилась окраска препаратов также по Гимза. Окрашенные препараты заделывались в канадский бальзам.

При проверке различных методов окраски мы могли подтвердить

наблюдения Piekarski [10, 11, 12, 13], Robinow [14], отмечавших лучшую окрашиваемость клеток после предварительного их гидролиза HCl, нагретой до 60°. Такая обработка несомненно повышает проницаемость клеток для красок, но так как она значительно изменяет нормальное состояние клетки, мы прибегали к ней в исключительных случаях, главным образом при окраске спор.

Реакция Feulgen производилась следующим образом. Препараты, фиксированные парами уксусной кислоты или жидкостью Карнуа, помещались в 96° спирт на 24 часа. Затем они переносились в нормальный раствор соляной кислоты, нагретой до 60°, и выдерживались в ней 7—8 минут. В дальнейшем препараты помещались в реактив Шиффа на 3 часа. Дальнейшая промывка в воде, содержащей SO_2, производилась в 3 сосудах в течение 20 минут в каждом. Заключительная промывка в водопроводной воде была возможно краткой — 30—40 секунд. В некоторых случаях клетки докрашивались раствором лихтгрюна. Высушенные фильтровальной бумагой препараты заделывались в канадский бальзам. Реакция Feulgen — ценный микрохимический метод, но она может только дополнить данные, которые дает цитологический анализ. Введение этого метода в микробиологическую практику дало весьма разноречивые данные в руках различных исследователей. В будущем несомненно будет выяснена причина этих расхождений, однако возможность вторичного окрашивания различных структур регенерировавшим фуксином весьма реальна, и она может служить источником ошибочной интерпретации микроскопических картин.

Что касается других микрохимических реакций и действия различных растворителей, то они будут указаны при дальнейшем изложении.

Микроскопические структуры, ошибочно принимаемые за ядра

Микроскопируя живые неокрашенные клетки неспороносных бактерий, легко обнаружить на полюсах клеток блестящие зерна. Такие полярные зерна постоянно содержатся в клетках B. coli, Proteus vulgaris, B. prodigiosum и других видов. Вещество зерен лишь незначительно плотнее, чем остальная цитоплазма бактериальной клетки, и поэтому довольно трудно окрасить зерна так, чтобы центральные участки клетки остались почти бесцветными. Обычно для этого препараты окрашивают слабыми растворами основных красок, например метиленблау 1 : 10 000 в течение 40—50 секунд. Крепкие растворы красок непригодны — вся клетка окрашивается диффузно и зерна не видны. В коротких вегетативных клетках полярные зерна довольно большие и поэтому только средняя треть клетки остается неокрашенной. В более удлиненных клетках зерна мельче и в виде темноокрашивающихся полушаровидных телец располагаются на полюсах клетки. Эти хромофильные полярные тельца никогда не делятся и не дают фигур, которые имели бы форму гимнастических гирь. Деление клеток предшествует образованию полярных телец и вскоре после деления каждая из дочерних клеток имеет два зерна (рис. 1, *11, 12*).

Биполярная зернистость может быть обнаружена не только у неспороносных бактерий, но также у спороносных видов с той лишь разницей, что у последних зерна меньше по величине и чаще имеют не полукруглую, а серповидную или дискообразную форму. Представление о полярной зернистости у различных бактерий дает рис. 1, *1—10*.

Описываемые тельца не растворяются в спирте, эфире, ацетоне, хлороформе, хлоралгидрате, серной и соляной кислоте, а также в растворах едкого и углекислого натра. Они не дают микрохимических реакций на жир (судан III, осмиевая кислота, диметиламидоазо-

бензол). Полярные зерна не дают явлений метахромазии, не окрашиваются поствитально нейтральротом, не растворяются в горячей воде — все это говорит о том, что зерна не состоят из метахроматина. От включений резервных веществ полярные зерна отличаются не только микрохимически. Весьма существенно, что они не уменьшаются в своих размерах при голодании бактерий и, наоборот, не увеличиваются при выращивании бактерий на средах, богатых углеводами или белками.

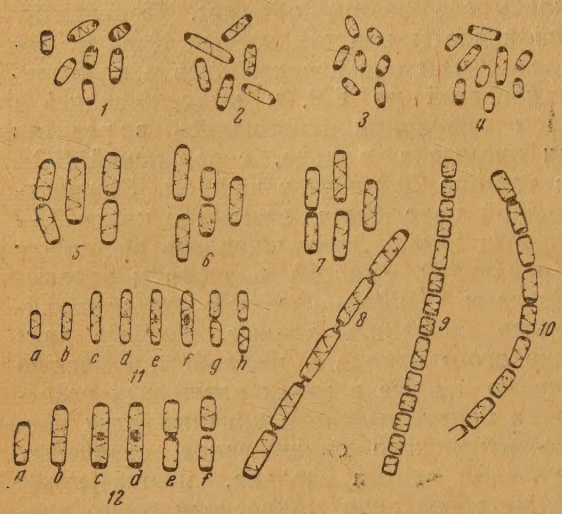


Рис. 1. Полярные зерна у различных бактерий. *1.* B. prodigiosum. *2.* B. pyocyaneum. *3.* B. coli. *4.* Proteus vulgaris. *5.* B. megatherium. *6.* B. mycoides. *7.* B. subtilis. *8.* B. megatherium. *9.* B. tumescens. *10.* B. ellenbachensis. *11.* B. fluorescens liquefaciens. *12.* B. megatherium

Биполярное окрашивание бактерий известно давно. Уже в 1897 г. Migula в своей «System der Bakterien» поместил прекрасную микрофотографию, на которой изображены полярные зерна B. typhi (Pl. IV, Fig. 1). В том, что в бактериальных клетках на полюсах могут быть окрашены зерна, никогда не возникало сомнений, и феномен биполярной окраски хорошо известен каждому микробиологу.

Однако сущность этого явления не всегда объяснялась правильно.

Довольно часто биполярному окрашиванию придавалось диагностическое значение, и этот признак считался характерным для представителей рода Pasteurella. В действительности же полярные зерна содержатся в клетках самых различных как патогенных, так и непатогенных бактерий, на что уже указывалось ранее (Максутов, Epstein). Таким образом биполярное окрашивание нельзя рассматривать как систематический признак.

Источником второго ошибочного объяснения следует считать работы Fischer, который связывал появление полярных зерен с плазмолизом бактериальных клеток. В действительности же зерна на полюсах клеток не имеют никакого отношения к тем морфологическим изменениям, которые претерпевают бактерии в гипертонических растворах. В частности биполярное окрашивание дают клетки, находящиеся в дистиллированной воде.

Наконец согласно третьей точке зрения, зерна, находящиеся на полюсах бактериальной клетки, представляют собой ядра. Так, по данным Enderlein, каждое полярное зерно соответствует «миху» и клетки с биполярной зернистостью обозначаются им как «димихиты», т. е. элементы, содержащие два ядра. Теория Enderlein, как недостаточно обоснованная в экспериментальном отношении, теперь имеет только исторический интерес. Однако в последние годы была опубликована серия работ Piekarski, в которых он описывает полярные тельца как «нуклеоиды» и считает их за ядра у бактерий. В том, что его «нуклеоиды» представляют собой зерна, окрашивающиеся на полюсах бактериальных клеток, не остается никаких сомнений, если мы сравним рис. 17а, приведенный в работе Piekarski и Ruska [13], с рисунками, приведенными в этой статье.

В действительности же феномен биполярного окрашивания бакте-

рий никакого отношения к проблеме ядра не имеет. Присутствие полярных зерен у самых различных бактерий (спороносные, неспороносные, спириллы), локализация их на самом конце клетки, то, что они не принимают участия в делении клетки, и ряд других соображений исключает возможность идентификации этих образований с ядрами. К этому следует добавить, что полярные зерна представляют собой структуры, лишь незначительно более плотные, чем остальные участки протоплазмы бактерий, что также противоречит нашим представлениям о ядре.

Способность клеток биполярно окрашиваться находит себе объяснение в том, что протоплазма, прилегающая к оболочке на полюсах клеток, имеет более плотную консистенцию и поэтому эти участки несколько хромофильнее, чем средняя часть клетки. Возможно, что такое строение играет роль в организации бактериальной клетки и более плотные полярные участки плазмы играют опорную функцию.

Отдельного рассмотрения заслуживают полярные зерна в длинных клетках, образующихся в культурах Proteus vulgaris. Как известно, колонии Proteus vulgaris на влажном мясопептонном агаре обладают способностью быстро распространяться по поверхности среды. Периферические части колонии состоят из длинных клеток, достигающих до 20—30 μ в длину. Рост бактериальных клеток происходит быстро, тогда как деление их на отдельные особи запаздывает и поэтому клетки удлиняются. Такое состояние является временным, и длинные особи распадаются затем на отдельные короткие клетки. Именно поэтому в центральных частях той же колонии содержатся короткие бактерии, имеющие обычный для Proteus vulgaris вид.

При окраске таких длинных клеток основными красками в них обнаруживаются зерна, расположенные на известном расстоянии друг от друга. Чем длиннее клетка, тем больше в ней зерен. Это отчетливо видно на рис. 2, на котором изображены окрашенные клетки.

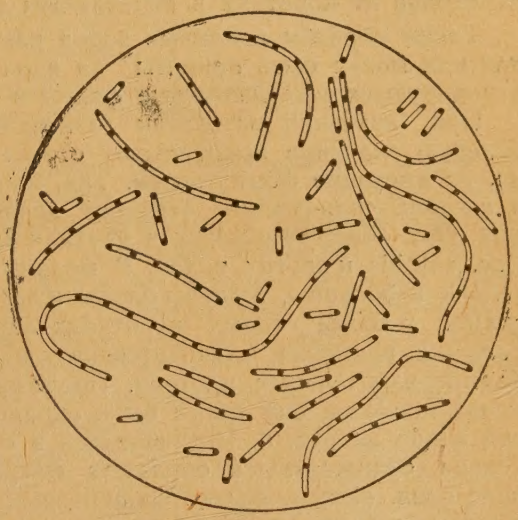


Рис. 2. Удлиненные клетки Proteus vulgaris. В клетках уже имеются полярные зерна, но нити еще не распались на отдельные клетки

Сравнительно недавно эти образования были описаны некоторыми авторами как ядра или нуклеоиды в клетках Proteus vulgaris (Piekarski, Robinow, Пешков [6]).

Однако цитологический анализ выясняет, что находящиеся в длинных клетках зерна являются не чем иным, как полярными зернами, принадлежащими отдельным клеткам, перегородка между которыми еще не образовалась. За это говорят следующие факты.

Количество зерен, содержащееся в длинной нити, всегда четное, и это вполне понятно, так как каждый клеточный элемент, входящий в состав нити, имеет два полярных зерна. Расстояние зерен друг от друга равно длине бактериальной клетки. Так, при измерении коротких и длинных клеток Proteus vulgaris были получены следующие цифры. Величина обычных коротких клеток, обладающих двумя зернами, равнялась 0,6—0,8 μ × 1,5—2,1 μ. Средняя длина коротких нитей, состо-

ящих из четырех клеток, была 7,5 μ, а нити, состоящие из восьми бактерий, имели длину 15,5 μ. Таким образом закономерно, что расстояние между зернами, находящимися в длинных клетках, бывает равно короткой вегетативной клетке, имеющей биполярные зерна. Далее следует отметить, что все длинные клетки имеют на полюсах полярные зерна полушаровидной формы, размер которых равен в среднем 0,5 μ. Что же касается зерен, находящихся в других участках длинных форм, то все они значительно крупнее и состоят из двух полушарий, обращенных друг к другу выпуклой стороной. Общая картина та же, что и в цепочках спороносных бактерий (рис. 1, *8*, *9*, *10*), но только с той разницей, что у спороносных видов уже имеются перегородки между клетками, тогда как длинные клетки Proteus vulgaris представляют собой как бы цепочку клеток, между которыми еще не образовались перегородки.

Все микрохимические реакции и отношение к различным растворителям подтверждают полную идентичность этих структур с полярными тельцами коротких форм.

В дальнейшем соотношение между процессами роста и деления выравнивается, длинные формы делятся на отдельные клетки. Обычно длинная нить делится на 2—3 отрезка, которые затем расчленяются на единичные клетки. Этим объясняется тот факт, что в поле зрения нередко видны бактерии самой различной длины, составляющие всю гамму переходов от коротких к нитевидным элементам.

Таким образом полярные зерна как в коротких, так и в длинных клетках могут быть приняты за ядра только в тех случаях, когда игнорируются уже известные факты в области цитологии микробов.

При изучении цитологии бактерий, особенно при поисках ядра, большое значение приобретают структуры, не состоящие из хроматина, но имеющие форму зерен. Так, наиболее постоянным образованием в клетках спороносных бактерий являются липопротеиновые включения. Они обнаруживаются в клетках Bac. mycoides, Bac. mesentericus, Bac. subtilis и других видов. В молодых клетках эти включения сравнительно небольшие, лишены блеска и легко окрашиваются основными красками, в более старых культурах липопротеиновые тельца достигают больших размеров, становятся блестящими и уже трудно окрашиваются без предварительных протрав. После предварительной обработки пикриновой кислотой они могут быть окрашены основными красками, как это видно на рис. 3. Увеличиваясь в своих размерах, липопротеиновые тельца сближаются и образуют фигуры, напоминающие гимнастические гири. Если в клетке спороносных бактерий имеются два соприкасающихся друг с другом тельца, то создается впечатление, что эти включения делятся (рис. 3 *а*). Такие микроскопические картины неоднократно описывались как деление «ядер». В литературе липопротеиновые тельца в клетках спороносных бактерий рядом авторов обозначались как нуклеозомы ядра, михи и т. п. (Barnand, Hollande, Enderlein, Stille, Klinckowström и др.). Следует отметить, что в свое время работа Hollande, описывавшего у бактерий нуклеозомы, была подвергнута вполне заслуженной критике со стороны Guilliermond, который указал, что нуклеозомы представляют собой жировые включения.

Иногда за ядра у бактерий принимаются хромофильные включения, возникающие в результате плазмолиза или сморщивания содержимого бактериальной клетки. Такие изменения могут быть вызваны самыми различными причинами: высокой температурой, ядами, гипертоническими растворами и т. п. Протоплазма отстает от оболочки и сжимаясь собирается в средней трети клетки в виде компактного тельца, тогда как пустые концы клеток почти совершенно прозрачны. Исследователь, мало знакомый с морфологией патологически измененной бактериаль-

ной клетки, легко может принять такую плотную центральную структуру за ядро, находящееся в клетке. Так произошло с Piekarski и Ruska, которые обнаружили в клетках ряда бактерий с помощью микрофотографии препаратов в электронном микроскопе «нуклеоиды».

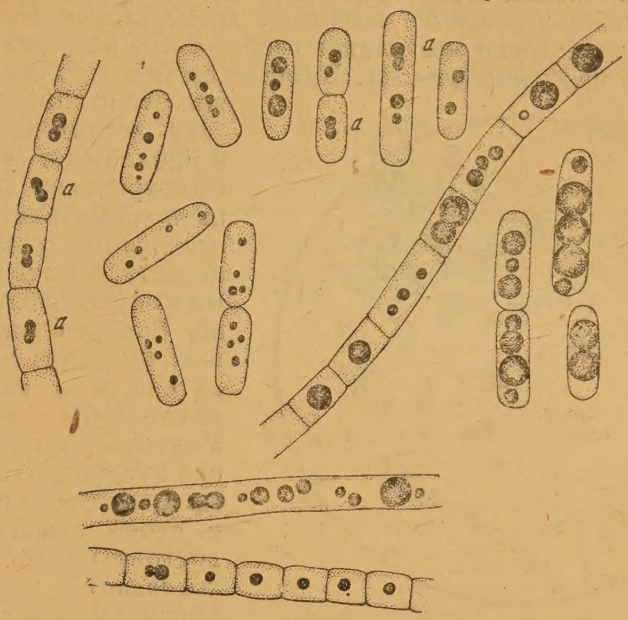


Рис. 3. Липопротеиновые тельца в клетках спороносных бактерий

Описываемые ими «вторичные формы» бактерий содержат в центральной части клетки крупное компактное образование, рассматриваемое упомянутыми авторами как обособленное ядро у бактерий (нуклеоид). Для «вторичных форм» бактерий характерно присутствие одного нуклеоида в центре клетки, тогда как в «первичных формах» имеется два нуклеоида на полюсах клетки. Произведенный снимок B. coli в электронном микроскопе убедил нас в том, что в результате высокой температуры, которой могут подвергнуться клетки в течение этой процедуры, бактерии иногда сильно плазмолизируются и концы клеток становятся пустыми [1]. Эти плазмолизированные клетки идентичны со «вторичными формами», содержащими нуклеоиды и изображенными в работе Piekarski и Rusca на рис. 13, 24, 25—30. Таким образом два нуклеоида, находящиеся на полюсах клеток и описываемые этими авторами в «первичных формах» бактерий, представляют собой, как это уже было показано ранее, полярные зерна. Располагающийся же в центре «вторичных форм» один нуклеоид является не чем иным, как сморщенным содержанием всей бактериальной клетки.

Выше мы ограничились рассмотрением только некоторых внутриклеточных структур, ошибочно принимаемых у бактерий за ядра. Конечно, разобранные случаи не исчерпывают всех возможных источников заблуждений, но обычно при проверке любой работы, в которой ошибочно описываются обособленные ядра у бактерий, можно выяснить причину неправильной интерпретации микроскопических картин.

Физиологическое отмешивание хроматина

Хроматин, распределенный в бактериальной клетке диффузно, может в определенные периоды жизни бактерий отмешиваться и давать

[1] Снимок был произведен А. Е. Крисс, за что считаю своим долгом выразить ему благодарность.

обособленные в морфологическом отношении структуры. Обычно это происходит в тот перид, когда заканчивается активное размножение клеток и наступает образование стадий покоя — спор, микроцист и пр.

В самом начале образования спор происходит отмешивание ядерной субстанции и в клетке возникает хроматиновое зерно. В некоторых участках колонии все клетки спороносных бактерий могут содержать такие проспоры (рис. 4). Вначале весьма небольшое хроматиновое зерно постепенно достигает значительных размеров и продолжает увеличиваться. Одновременно с концентрацией хроматина в одном месте остальные участки клетки перестают быть хромофильными и окрашиваются очень бледно. Вопрос о том, в какой степени проспора состоит из хроматина и в какой мере из цитоплазмы,— решить трудно. Учитывая высокое содержание нуклеопротеидов в клетке, следует думать, что проспора в своей значительной части состоит из хроматина, и это совпадает с тем, что зрелые проспоры дают положительную реакцию по Feulgen. Размеры проспоры говорят о том, что значительного набухания отмешенного хроматина не происходит. Повидимому, это связано с тем, что хотя тимонуклеиновая кислота при отмешивании и переходит в высоко молекулярное состояние, но она не образует гидрофильных сгустков, увеличивающихся благодаря обогащению их водой.

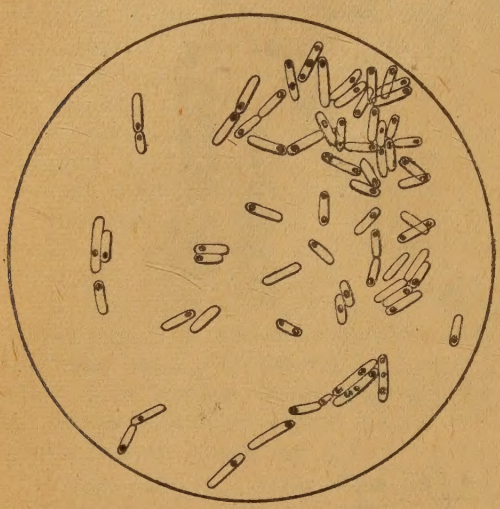


Рис. 4. Отмешивание хроматина в виде зерен при образовании проспор у Bac. mycoides

Таким образом хромофильное зерно (проспора), состоящее из хроматина и дающее реакцию по Feulgen, возникает у бактерий de novo. В молодых вегетативных клетках, размножающихся делением, эта структура отсутствует и никогда никем описана не была. Во время формирования проспоры в нее не проникают ядра, нуклеоиды или хромозомы, а организация споры происходит вокруг хроматина, постепенно отмешивающегося в одном из участков клетки. Эти факты общеизвестны и абсолютно достоверны, но, к сожалению, они забываются исследователями, описывающими обособленные ядра.

Можно ли зерно хроматина, которое представляет собой проспора, считать за ядро? Конечно, нет. Говоря об этом «ядре», нельзя сказать, что оно в свою очередь возникло из ядра. Хромофильное тельце представляет собой одну из возможных форм существования диффузного ядра — это временное обособление хроматина, его отмешивание и этот процесс, конечно, носит обратимый характер.

Отмешивание хроматина — явление обычное при образовании стадий покоя. Оно наблюдается не только у Eubacteriales, но и у более сложно организованных бактерий — Myxobacteriales. В частности у Myxococcus (Cytophaga) Hutchinsonii ядерная субстанция из диффузного состояния переходит в морфологически обособленное и собирается сначала в четыре, а затем в два зерна, которые, сливаясь, образуют хроматиновое тельце. Эти цитологические изменения сопровождаются постепенным укорочением вегетативной клетки и превращением ее в микроцисту. Последняя содержит упомянутое выше хроматиновое зерно.

Таким образом у бактерий при формировании клеточных элементов, неспособных к размножению, ядерное вещество образует хроматиновые структуры.

Вернемся к цитологии спорообразующих бактерий. Зрелая проспора в более старых культурах бактерий сжимается и это приводит, повидимому, к дальнейшему сгущению содержимого и ее обезвоживанию. Вскоре вслед за этим она одевается оболочкой и перестает окрашиваться.

Совершенно очевидно, что обособленное хроматиновое зерно продолжает оставаться в зрелой споре, но благодаря трудной проницаемости оболочки споры зерно при обычных методах окраски не выявляется. Однако достаточно увеличить проницаемость оболочки обработкой препарата соляной кислотой перед окраской (*N* HCl, нагретая до 60° в течение 7—10 минут) и в споре уже начинает окрашиваться хромофильная структура (рис. 5). Такие зерна хроматина в спорах после

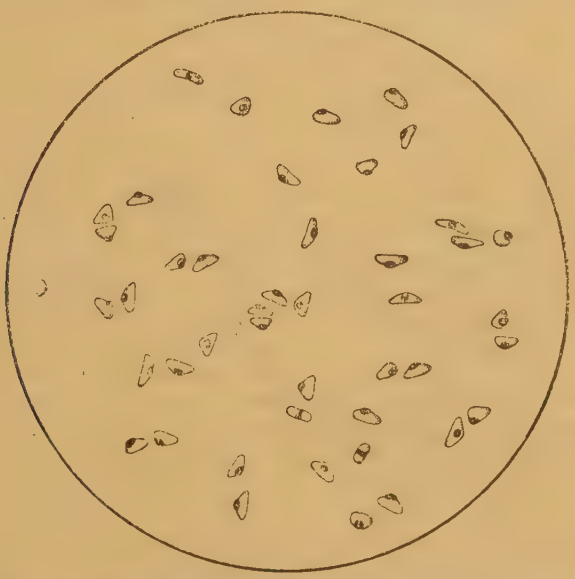


Рис. 5. Хромофильные зерна в спорах Bac. mycoides (обработка HCl перед окраской)

обработки их кислотой уже описывались Piekarski, Robinow. При помещении спор в свежую питательную среду они набухают, и в них также могут быть обнаружены окрашивающиеся зерна, но уже при самых обычных методах фиксации и окраски препаратов. Обычно хроматиновые структуры в прорастающих спорах имеют характер интенсивно окрашивающихся поясков. В дальнейшем наступает прорастание споры. Содержащийся в ней морфологически обособленный хроматин в молодой палочке, выходящей из споры, обнаруживается в виде зерна. Присутствие хроматинового зерна в палочках, покидающих спору, было обнаружено ранее при изучении цитологии анаэробного бацилла Granulobacter pectinovorum (Имшенецкий). У аэробных спороносных бактерий так же постоянно могут быть окрашены в клетках, прорастающих из споры, хроматиновые тельца, лежащие в центре клетки. Иногда таких телец бывает несколько.

В дальнейшем обособленные хроматиновые структуры уменьшаются в своих размерах, как бы тают, и хроматин снова переходит в диффузное состояние, т. е. распределяется по всей клетке. По этой причине бактерии в молодых культурах никогда не содержат зерен хроматина, или «нуклеоидов». Схематично процесс отмешивания хроматина

и переход его снова в диффузное состояние изображены на рис. 6. Более детальное описание цитологии прорастания спор не входит в задачу этой статьи, и оно будет сделано в другой работе.

При прорастании микроцист у миксобактерий мы сталкиваемся с аналогичной картиной. Ядерное вещество, содержащееся в микроцистах в виде зерен, при прорастании распределяется равномерно по всей вегетативной клетке, и в ней уже не удается окрасить хроматиновые структуры.

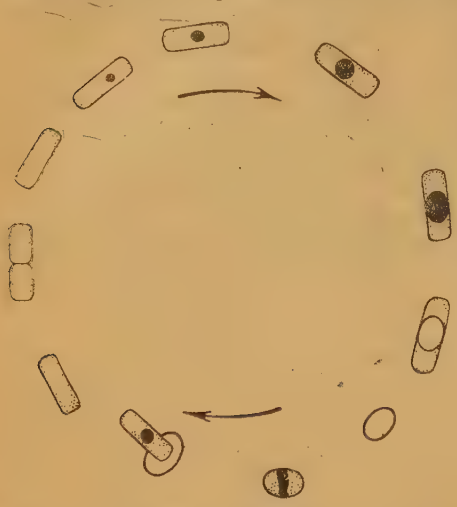


Рис. 6. Отмешивание хроматина в клетках спороносных бактерий при образовании спор и обратный переход обособленного хроматинового тельца в диффузное состояние при прорастании споры (схематично)

Таким образом отмешивание хроматина, наблюдающееся у бактерий при образовании стадий покоя (спор, микроцист), носит обратимый характер и при их прорастании ядерная субстанция снова переходит в диффузное состояние.

Патологическое отмешивание хроматина

Нормальная палочковидная форма бактерий сохраняется только при определенных условиях существования бактерий. При нарушении этих условий морфология бактерий изменяется, причем факторы, непосредственно вызывающие морфологическую реакцию, бывают различными. Это может быть низкая или высокая температура, продукты собственной жизнедеятельности микробов, соли, особенно LiCl и $MgSO_4$, различные яды и т. п. Под влиянием одного из этих факторов или их комплекса у бактерий возникают реактивные формы, внешний вид которых варьирует. Это крупные шаровидные, лимонообразные или напоминающие трипанозом клетки. Такие реактивные формы уже давно были известны в микробиологии под именем инволюционных или дегенеративных форм. Однако некоторые исследователи, увлеченные столь необычным видом гигантских реактивных форм, считали эти атипические элементы за одну из стадий жизненного цикла бактерий и появление их в культуре рассматривали не как патологическое, а как нормальное явление (Almquist, Löhnis, Enderlein и др.). Все эти теории не выдержали экспериментальной проверки, и совершенно очевидно, что превращение палочковидных бактерий в крупные клетки, напоминающие дрожжи, представляет собой патологический процесс, вызываемый изменением окружающих условий. Такие гигантские клетки в дальнейшем лопаются, и от них остается только аморфный распад.

Крупные реактивные формы имеют непосредственное отношение к проблеме ядра у бактерий. Объясняется это тем, что хроматин, распределенный в нормальной клетке диффузно, отмешивается в гигантских реактивных формах и в них возникают обособленные хромофильные тельца. Образование таких ядерных форм неоднократно привлекало внимание исследователей, и, так как такое отмешивание происходит только в реактивных клетках, то за его причину естественно следует считать те же факторы, которые вызывают образование реактивных форм. Гигантские клетки с зернами хроматина нередко обнаруживаются во вторичных колониях неспороносных бактерий (Покровская, Коробкова и Котельников); они образуются также от действия бактериофага (Жуков-Вережников и Фриауф [3]), у бактерий, выросших на средах

с сахарами (Коробкова и Котельников [5]), от действия солей (Uher) и других причин. Аналогичное отмешивание хроматина под влиянием хлористого лития наблюдали Pietschmann и Rippel у Bacillus mycoides, но эти авторы не связывают эти изменения с циклом развития бактерий.

В наших исследованиях мы культивировали Bact. coli и Proteus vulgaris на мясопептонном агаре с 0,5 моля хлористого лития. На этих средах клетки неспороносных бактерий вначале приобретают веретенообразную форму, и в их центральной части окрашивается по Гимза в

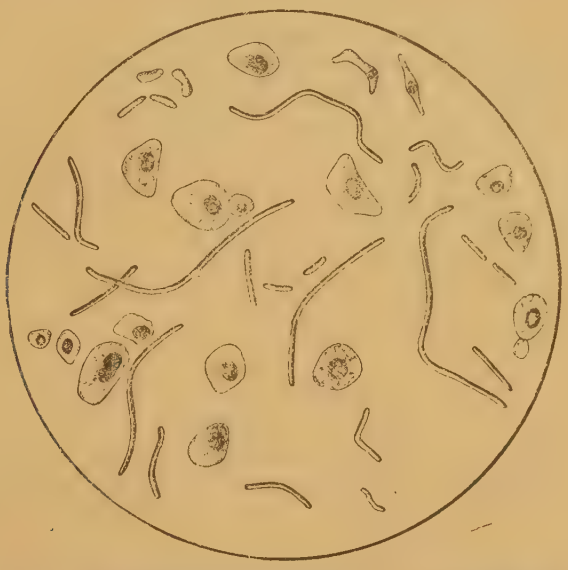


Рис. 7. Дегенеративные формы B. coli. В крупных клетках патологическое отмешивание хроматина

пурпурный цвет хромофильное тельце. Затем такие клетки довольно быстро превращаются в гигантские, достигающие 6—9 μ клетки грушевидной, овальной или шаровидной формы, в центральных частях, которых легко обнаруживаются хроматиновые включения, дающие положительную реакцию по Feulgen и легко окрашивающиеся основными красками (рис. 7). Реже при отмешивании хроматина в гигантских клетках возникают 2—3 хромофильных тельца, но вообще нужно сказать, что очертания, величина и локализация таких телец могут быть весьма разнообразными. Если образование хроматиновых структур происходит в двух только что разделившихся, а затем начавших раздуваться клетках, то создается впечатление, что деление ядра предшествовало делению клеток.

Все эти морфологические изменения находят себе следующее простое объяснение. Под влиянием различных неблагоприятных условий нарушается нормальная жизнедеятельность и структура бактериальных клеток. Наступают дегенеративные изменения, в основе которых лежит повышение гидрофильности клеточных коллоидов. Благодаря изменению проницаемости клетки обогащаются водой и размеры их резко увеличиваются. Эти изменения сопровождаются отмешиванием ядерной субстанции от цитоплазмы и возникновением в клетке одного или нескольких обособленных хроматиновых телец. Нормальная структура клеток при этом нарушается, в частности у неспороносных клеток уже нельзя обнаружить биполярных зерен.

Отмешивание хроматина в различных реактивных формах приводит

к образованию обособленных телец, размер которых может быть не только равным величине нормальной вегетативной клетки, но даже превышать ее. Трудно предположить, что в условиях, вызывающих дегенерацию, происходит вообще синтез тимонуклеиновой кислоты, а тем более в таких значительных количествах. Гораздо логичнее предположить, что возникновение крупного обособленного тельца связано с тем, что одновременно с отмешиванием хроматина происходит переход низкомолекулярной тимонуклеиновой кислоты в высокомолекулярную, способную давать легко набухающие сгустки. Поэтому абсолютное количество хроматина в крупных реактивных формах остается обычным, но размеры отмешанных структур благодаря значительному набуханию могут быть весьма большими. Такое отмешивание имеет внешнее сходство с физиологическим отмешиванием хроматина, о котором говорилось выше, но это только внешняя аналогия, так как в основе этих процессов лежат разные причины и патологическое отмешивание в отличие от физиологического носит необратимый характер.

Таким образом появление в гигантских реактивных клетках хроматиновых телец неразрывно связано с теми дегенеративными изменениями живого вещества клетки, которое в конечном счете приводит ее к гибели. Совершенно очевидно, что эти хроматиновые структуры нельзя считать за ядра, а отмирающие реактивные формы за «ядерную стадию» в жизненном цикле бактерий.

* *
*

Какие требования должны быть предъявлены к структуре, описываемой как морфологически обособленное ядро? Что необходимо выполнить, прежде чем назвать данное включение хромозомой, ядром или нуклеоидом?

Остановимся только на наиболее существенных моментах.

1. Структура, принимаемая за ядро, должна обнаруживаться во всех стадиях онтогенетического развития клетки. Она должна содержаться в бактериальных клетках, взятых как из молодых, так и из старых культур. Если в определенные периоды жизни бактерий в результате отмешивания хроматина, распыленного в клетке, происходит образование обособленного тельца, которое затем снова переходит в диффузное состояние, то такое тельце нельзя считать за индивидуализированное ядро. Это одно из состояний диффузного ядра.

2. Описывая ядро, исследователь должен давать одновременно характеристику и другим включениям, содержащимся в бактериальной клетке (липопротеиновые тельца, полярные зерна, проспоры, метахроматин и др.).

3. Обнаруживаемые ядра не должны исчезать в клетке при ее голодании, и размеры этого тельца не должны резко увеличиваться на средах с углеводами. Экспериментальная морфология дополняет данные цитологического анализа.

4. Возникновение хроматиновых телец не должно происходить при культивировании бактерий в ненормальных условиях, вызывающих дегенерацию культуры. Такое отмешивание хроматина является ненормальным, и образующиеся при этом структуры ничего общего с ядрами не имеют.

Таковы те пункты, которые должны быть учтены прежде чем будет сделан окончательный вывод о характере описываемой структуры.

В истории биологии учение о диффузном ядре у бактерий неразрывно связано с теорией хромидиальных ядер и после работ Hertwig казалось, что ряд одноклеточных организмов имеет хромидиальные ядра. Однако углубленное изучение цитологии протистов постепенно умень-

шало число организмов, обладающих хромидиальным ядром, и у многих из них установлено не только существование ядра как сложной, постоянно существующей системы, но и митотическое его деление. Это направление работ привело к тому, что возможность регенерации ядра из отдельных зерен хроматина стала вообще отвергаться. Следуя этой концепции, все живые существа должны иметь обособленные ядра, и положение omnis nucleo ex nucleo признано закономерным. Такая точка зрения встречает особенную поддержку со стороны современной цитогенетики, для которой отсутствие хромозом или обособленных хроматиновых зерен создает известные трудности при распространении теории гена на микробов.

Однако все попытки доказать существование ядер или хромозом у бактерий, попытки, продолжающиеся более пятидесяти лет, не позволяют считать существование обособленных ядер у бактерий доказанным. Проверка работ, в которых сообщается об открытии ядра, всегда выясняет источник ошибки.

В данной статье приведены только некоторые возможные причины неправильного толкования микроскопических картин. В тех же случаях, когда сообщалось о ядре, не вызывающем сомнений, в дальнейшем выяснилось, что оно по ошибке было описано не у бактерий, а у грибов (Goodrich).

Представление о бактериальном ядре как о необычно мелкой структуре, обнаружить которую можно только с помощью особых методов исследования (микроскопия в ультрафиолетовом свете, электронный микроскоп), недостаточно обосновано. Наоборот, высокое содержание тимонуклеиновой кислоты в бактериальной клетке нельзя согласовать с существованием «миниатюрных» ядер. Это находит себе подтверждение и в том, что у более сложно организованных миксобактерий (Polyangium, Melittangium, Chondromyces) постоянно содержатся в клетках обособленные ядра довольно крупных размеров.

Результаты цитологических исследований говорят о том, что среди ныне существующих одноклеточных организмов имеется обширная группа живых существ с относительно примитивной организацией. В их протоплазме уже содержится, и в очень большом количестве, тимонуклеиновая кислота, которая безусловно является специфическим компонентом ядерного вещества. Образование тимонуклеиновой кислоты, возможно, произошло из цитоплазматической дрожжевой нуклеиновой кислоты на более ранних стадиях эволюции.

Содержащееся у бактерий ядерное вещество распределено в клетке диффузно, и такое состояние является первичным, так как трудно допустить регрессивное превращение обособленного ядра в распыленное состояние. Таким образом бактерии имеют ядерное вещество, весьма близкое и скорее идентичное с ядерной субстанцией высших растений и животных, но морфологического обособления, т. е. возникновения индивидуализированного, ядра на этой ступени эволюции еще не наступило. С этой точки зрения способность хроматина отмешиваться в клетке и давать обособленные хроматиновые структуры должна рассматриваться как прогрессивный признак.

Чем выше организация одноклеточного существа, тем легче и чаще происходит отмешивание хроматина. В частности физиологическое отмешивание ядерной субстанции при образовании стадий покоя относится к этой категории явлений.

Концепция диффузного ядра позволяет понять процесс эволюции ядерного аппарата. Тезис о том, что каждое ядро возникает и всегда возникало только благодаря делению аналогичного образования не может объяснить ни появления первого примитивного ядра, ни процесса его постепенного усложнения. Предположение о том, что сложный

ядерный аппарат, существующий сейчас у низших растений и животных, возник сразу,— абсолютно не выдерживает критики. Логичнее предположить, что вначале появилась в клетке ядерная субстанция, затем примитивный ядерный аппарат, который, повидимому, нельзя называть ядром, так как в нем отсутствуют хромозомы при делении клеток, и наконец, та сложная структура, какой является митотически делящееся ядро.

Считая присутствие ядра и хромозом обязательным для каждой клетки, трудно представить себе строение ультрамикробов. Наоборот, теория диффузного ядра позволяет считать такие формы за регрессивные, произошедшие от клеток с диффузным ядром, но сильно уменьшившиеся в процессе адаптации в своих размерах.

Отсутствие ядра и хромозом у бактерий ни в коей мере не позволяет отрицать стойкое наследование тех свойств микробов, которые характерны для данного вида. Что же касается вопроса о содержании цепочки генов в бактериальной клетке, то, не отрицая этой возможности, надо отметить, что при современном состоянии наших знаний этот вопрос не может быть решен экспериментальным путем.

Выводы

1. Ядерная субстанция распределена в бактериальной клетке диффузно и не образует морфологически обособленного ядра. Благодаря высокому содержанию в бактериальной клетке специфического компонента ядерного вещества — тимонуклеиновой кислоты возможность существования у бактерий ядер, незначительных по своим размерам, отпадает.

2. В ряде работ, опубликованных в последнее время, за индивидуализированное ядро принимались липопротеиновые тельца, полярные зерна или другие включения.

3. В процессе онтогенетического развития хроматин, распределенный в клетке диффузно, может отмешиваться, образуя морфологически обособленные зерна. Такое отмешивание происходит при образовании форм покоя (спор, микроцист) и носит физиологический характер. При прорастании покоящихся форм хроматин снова распределяется равномерно по всей клетке.

4. Под влиянием самых различных факторов бактерии образуют крупные клетки веретенообразной, грушевидной или шаровидной формы. Образование таких гигантских клеток является признаком дегенерации культуры. В этих реактивных формах происходит отмешивание хроматина, которое приводит к появлению в клетке обособленных зерен. Такое отмешивание ядерного вещества носит патологичекий характер и гигантские клетки нежизнеспособны.

Теория диффузного ядра позволяет рассматривать бактерии как относительно примитивные организмы, у которых уже произошла химическая дифференциация ядерного вещества, но еще не наступило его морфологическое обособление.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 2.XII.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Белозерский А. О ядерном веществе у бактерий. Микробиология т. VIII, стр. 504, 1939.
2. Белозерский А. О количественном содержании белков и нуклеиновых кислот в бактериальной клетке. Микробиология, т. IX, стр. 107, 1940.
3. Жуков-Вережников Н. и Фриауф В. К вопросу о сущности и значении феномена «бактериофагии» II. Морфологические изменения B. typhi abdominalis под влиянием «бактериофага». Вестн. микроб., эпидем. и паразит., 13, 263 1934.

4. Имшенецкий А. Строение бактерий. Москва, 1940.
5. Коробкова Е. и Котельников Г. Цитологические наблюдения над B. paratyphi в процессе диссоциации. Вестн. микроб., эпидем. и паразит., 13, 175, 1934.
6. Пешков М. Кариологические особенности бациллярных форм Proteus vulgaris и его швермеров. Рефераты работ учреждений Отделения биологич. наук АН СССР за 1940 г. Москва, 1941.
7. King R. and Beams H. Ultracentrifugation and cytology Spirillum volutans. J. Bact., v. 44, p. 597, 1942.
8. Knaysi G. and Mudd S. The internal structure of certain bacteria as revealed by the electron microscope. A contribution to the study of the bacterial nucleus. J. Bact., v. 45, p. 349, 1943.
9. Lewis J. The genus Spirillum Ehbg. with special reference to cell inclusion and the chromidial theory. J. Bact., v. 40, p. 27, 1940.
10. Piekarski G. Zytologische Untersuchungen an Bakterien im ultravioletten Licht. Ctbl. Bakt., Abt. 1, Orig. Bd. 142, S. 69, 1938.
11. Piekarski G. Lichtoptische und übermikroskopische Untersuchungen zum Problem des Bakterienzellkernes. Ctbl. Bakt., 1. Abt., Orig. Bd. 144, S. 140, 1939.
12. Piekarski G. Ueber kernähnliche Strukturen bei Bacillus mycoides Flügge. Arch. f. Mikrob., Bd. 11, S. 406, 1940.
13. Piekarski G. und Ruska H. Ueber mikroskopische Untersuchungen an Bakterien unter besonderer Berücksichtigung der sogenannten Nucleoide, Arch. f. Mikrob., Bd. 10, S. 302, 1939.
14. Robinow C. A study of the nuclear apparatus of Bacteria. Proc. Roy. Soc., v. 130, p. 299, 1942.
15. Schaede R. Zum Problem des Vorkommens von chromatischer Substanz bei Bakterien und Auctinomyceten. Arch. f. Mikrob., Bd. 10, S. 473, 1939.

ON THE NUCLEAR APPARATUS OF BACTERIA

A. A. Imšenecki

Summary

1. The nuclear substance is diffusely distributed in the bacterial cell and does not form a morphologically isolated nucleus. Since the specific component of nuclear substance, thymonucleic acid, is contained in the bacterial cell in great quantity, the possibility of the existence of nuclei of an insignificant size in bacteria must be excluded.

2. In numerous works published recently and advocating the existence of an individualized nucleus in the bacterial cells lipoproteinic corpuscles, polar granules and other inclusions were mistaken for the nucleus by the authors.

3. In the course of ontogenetic development chromatin, which is diffusely distributed in the cell may sedimentate and form morphologically isolated granules. Such sedimentation takes place when latent forms (spores, microcysts) arise and has a physiological character. When these latent forms germinate chromatin is again uniformly distributed throughout the cell.

4. Under the influence of most different factors bacteria form largesized cells of a spindleshaped, pearlike or spheric form. The formatiotn of such giant cells is a symptom of degeneration of the culture. Sedimentation of chromatin takes place in these reactive forms and it leads to the appearance of isolated granules in the cell. This sedimentation of nuclear substance has a pathological character and the giant cells are not viable.

5. The theory of the diffuse nucleus permits to regard bacteria as relatively primitive organisms, in which chemical differentiation of nuclear substance has already taken place but its morphological isolation has not as yet been reached.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

МИЦЕТИН И ЕГО БАКТЕРИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА

Н. А. Красильников и А. И. Кореняко

В 1938 г. нами был описан один штамм лучистого грибка Actinomyces violaceus, который обладает резко выраженными антибактериальными свойствами. Вещество, образуемое этим грибком, выделяется из клеток и проникает в среду. Предварительные сведения о свойствах данного вещества были описаны в 1939 г. Отличая это вещество от описанных Waksman [4], Welsh [5], мы впоследствии назвали его мицетином. Ваксман выделил вещество от A. antibioticus, который отличается от мицетина резкой токсичностью для животных.

В настоящем сообщении приводятся данные дальнейшего изучения мицетина. Грибок, как указано было ранее, образует бактерицидное вещество только на синтетических средах. На средах белковых оно не образуется или образуется в малом количестве. Для получения мицетина мы пользовались агаризированной средой Чапека с 2% сахарозы (состав этой среды приведен нами раньше [1]). Агар Чапека разливался тонким слоем в широкодонные колбы или в матрацы или в чашки Петри и на поверхность застывшего агара производился посев грибка. Через 15—20 суток при температуре 25° грибок разрастается по всей поверхности, окрашивая субстрат в красивый, темнофиолетовый цвет. Такая культура считается созревшей для экстрагирования из нее мицетина.

Экстрагирование мы производили разными растворителями: водой, спиртом, бензолом и хлороформом. Лучшими из них оказались последние три. Экстрагировали мы сырую культуру или высушенную до воздушно-сухого состояния при температуре в 40—50°. Это имеет то преимущество, что культуру можно заготовлять впрок.

Готовая к обработке культура заливалась на 10—12 часов растворителем в равном объеме (1 : 1), а сухая 1 : 100 (на 1 г культуры 100 частей растворителя). Экстракт фильтровался через бумажный фильтр, и полученный фильтрат подвергался изучению на бактерицидность, лечебное свойство и химический состав.

Бактерицидное свойство мы изучали двумя методами: 1) методом посева на агаровые пластинки и 2) методом высева в мясопептонный бульон (МПБ). В первом случае в чашку Петри высевалась культура стафилококка — текст объекта и затем наносилась капля вытяжки мицетина. По стерильной зоне, т. е. по зоне отсутствия роста, стафилококка определялась активность мицетина. Второй метод применялся для определения титра мицетина в растворе. Мясопептонный бульон разливался по 5 см³ в каждую пробирку, затем прибавлялся мицетин в убывающих дозах: 0,1; 0,01; 0,001 и т. д. После этого все пробирки заражали равным количеством бактерий и выращивали в термостате при 35°. Через 2—3 суток по последнему разведению мицетина в пробирках, где отсутствовал рост, определялся результат.

Этими методами мы испытывали чувствительность разных представителей раневой микрофлоры — стафилококков, стрептококков, синегнойной палочки, протеуса и других неспороносных бактерий, затем туберкулезную палочку, дифтерийного возбудителя и возбудителя газовой гангрены.

Результаты этих исследований приведены в табл. 1.

Таблица 1

Чувствительность бактерий к мицетину

Название бактерий	Откуда получены	Смертельная доза мицетина
Staphyloc. aureus	Выделен из ран	1 : 100 000
» albus	» » »	1 : 100 000
Streptoc. hemolyticus	» » »	1 : 100 000
Mycobacter. tuberculosis	Музейный штамм	1 : 1 000
» album	Выделен из ран	1 : 10 000
» breve	» » »	1 : 10 000
Corynebacterium diphtheriae	Музейный штамм	1 : 1 000
Mycococcus albus	Выделен из ран	1 : 10 000
Bacillus mesentericus	» » »	1 : 10 000
» sp.	» » »	1 : 10 000
Pseudomonas pyocyanea	» » »	Не погибают в концентрированном растворе
Proteus vulgaris	» » »	
B. coli	» » »	

Как видно из таблицы, стафилококки, стрептококки, микобактерии, коринебактерии, микококки и спороносные бактерии весьма чувствительно реагируют на мицетин. Все они погибают от малых доз этого препарата. Неспороносные бактерии, напротив, совершенно не реагируют на мицетин. При воздействии больших доз (1 : 10) и даже в неразведенной водной вытяжке они не только не погибают, но хорошо развиваются в нем.

В последующих исследованиях, при испытании разных штаммов стафилококков нами установлено, что последние реагируют на мицетин с различной чувствительностью: одни штаммы стафилококков, стрептококков и микококков погибают при концентрации 1 : 10 000 и 1 : 30 000 этого препарата, другие — при разведении 1 : 50 000 (табл. 2). Разные штаммы микобактерий погибают при разведении 1 : 5 000 и 1 : 20 000.

Если взять предельно малую концентрацию мицетина, то гибель разных штаммов происходит в разные сроки. Одни штаммы (№ 3) погибают через несколько часов, а другие спустя 2—3 суток (шт. 7), в растворе мицетина 1 : 100 000.

Такие же данные получаются и с стрептококками, микобактериями, микококками. Разные штаммы, выделенные от разных больных, заметно отличаются чувствительностью друг от друга.

Таблица 2

Чувствительность разных штаммов бактерий к мицетину

Штаммы	Смертельная доза мицетина	Штаммы	Смертельная доза мицетина
Staphyloc. aureus шт. 1	1 : 100 000	Mycococcus шт. 2	1 : 100 000
» » » 3	1 : 500 000	» » 4	1 : 500 000
» » » 5	1 : 50 000	» » 6	1 : 50 000
» » » 7	1 : 10 000	» » 10	1 : 20 000
» » » 8	1 : 200 000	Streptoc. hemolyticus. шт. 9	1 : 200 000
» » » 12	1 : 70 000	» » » 11	1 : 150 000
» » » 18	1 : 20 000	» » » 13	1 : 80 000
Mycobacterium » 22	1 : 20 000	» » » 15	1 : 100 000
» » 23	1 : 10 000	» » » 16	1 : 50 000
» » 26	1 : 1 000	» » » 19	1 : 30 000
» » 35	1 : 5 000		

Мы полагаем, что такое различие штаммов обусловлено особенностями ран, в которых они находились. Каждый штамм индивидуали-

зировался в большей или меньшей степени в зависимости от характера раневого процесса у данного больного. Рана, как среда с ее индивидуальными особенностями, накладывает свой отпечаток на биологию микроорганизмов, населяющих ее.

Бактерицидные свойства мицетина проявляются в разных средах по-разному. Наиболее сильное действие его происходит в синтетической среде или в воде. В белковых средах, мясопептонном бульоне (МПБ), в кровяной сыворотке активность мицетина резко снижается (табл. 3). Следовательно, указанные среды обладают свойством инактивировать бактериальные вещества мицетина. Таким же свойством обладает и гной инфицированных ран.

Таблица 3

Бактерицидное действие мицетина в разных питательных средах. Концентрация мицетина, убивающая клетки бактерий

Культура бактерий	В воде	В МПБ	В сыворотке
Sraphyloc. aureus	1 : 100 000	1 : 50 000	1 : 10 000
» albus	1 : 10 000	1 : 5 000	1 : 2 000
Mycobacterium album	1 : 40 000	1 : 10 000	1 : 8 000

Мы испытывали мицетин в гное, разведенном водой. Гной, взятый пипеткой или тампоном из инфицированных, хронически протекающих ран больных, помещали в пробирки и разводили пополам водой, к нему прибавляли раствор мицетина в равных концентрациях. Через определенные промежутки времени производили из него высевы на мясопептонный агар в чашки и подсчитывали количество выросших бактериальных колоний. Предварительно или одновременно мы выделяли из гноя культуры бактерий и испытывали на чувствительность их к мицетину в МПБ. Оказывается, что одни и те же культуры погибали в мясопептонном бульоне от мицетина быстрее, чем в гное, из которого они выделены (табл. 4).

Таблица 4

Бактерицидное действие мицетина в гное

Штаммы	Смертельная концентрация мицетина	
	в МПБ	в гное
Staphyloc. aureus	1 : 100 000	1 : 50 000
» albus	1 : 40 000	1 : 10 000
Mycobacterium sp.	1 : 20 000	1 : 10 000
Mycococcus »	1 : 10 000	1 : 5 000

Подобная инактивация наблюдается с аспергиллином и стрептоцидом; надо полагать, что и с другими, если не со всеми бактерицидными препаратами происходит то же.

Этим, очевидно, можно объяснить слабое антибактериальное действие испытанных нами препаратов (мицетина, аспергиллина, стрептоцида) в ранах больных.

Мы испытывали мицетин на многих инфицированных ранах и во всех случаях наблюдали слабое его действие даже на очень чувствительные штаммы микробов. При тщательных обильных промываниях ран концентрированным препаратом мицетина мы почти никогда не получали полного устранения ни стафилококков, ни стрептококков и, тем более, других видов раневой микрофлоры. Только при многократ-

ном применении этого препарата удавалось изменить состав последней и устранить некоторые виды ее.

В сильно инфицированных ранах, да и во всякой ране живая ткань и содержимое раны представляют весьма сложный органический субстрат, защитные свойства которого, надо полагать, весьма разнообразны.

Значительная часть препарата прежде всего адсорбируется частицами гноя, затем, вероятно, происходит ферментативная и другая химическая переработка его. Так или иначе в таком сложном субстрате препарат становится менее активным или совсем неактивным.

Инактивирующее действие на бактерицидные препараты оказывают некоторые нечувствительные бактерии. Эти бактерии, не реагируя на препараты, защищают от гибели чувствительные виды микробов. Чувствительные организмы в присутствии бактерий-защитников становятся менее чувствительными. Штаммы, инактивирующие мицетин, мы обнаруживали среди грамотрицательных бактерий. Такими свойствами обладает кишечная палочка, затем выделенные нами из почвы неспороносные бактерии из группы Pseudomonas, а также некоторые бактерии со слизистой капсулой типа B. radiobacter. Всего мы имеем 7 таких штаммов бактерий, с которыми производим дальнейшие опыты.

В пробирки с МПБ высевалась культура бактерий-защитников, а через 12—20 часов подсевался чувствительный стафилококк. Бактерицидные дозы мицетина (1 : 100 000) в одних случаях прибавлялись в начале, вместе с бактериями, в других — после внесения стафилококков. В том и в другом случае активность мицетина определялась по развитию стафилококков, путем высева культуры на МПА в чашках Петри. Результаты этих опытов даны в табл. 5.

Таблица 5

Защитное влияние микробов от бактерицидного действия мицетина. Опыты в МПБ в присутствии препарата в разведении 1 : 100 000

Бактерии-защитники	Развитие стафилококка	Развитие бактерий
Staphyloc. aureus (Контроль)	—	—
+ B. coli	++++	++++
+ Ps. fluorescens шт. 1	+	++++
+ » » » 3	++++	++++
+ » » » 5	+++	++++
+ B. radiobacter	++	+++++
+ Bacter. sp. шт. 7	+	+++
+ » » » 9	++++	+++

Как видно из таблицы, чистая культура стафилококка погибает через 12 часов в МПБ в присутствии предельной дозы мицетина 1 : 100 000. В смешанных культурах с кишечной палочкой тот же стафилококк не только не погибает, но даже хорошо развивается. В препарате обнаруживается столько же клеток стафилококка, сколько и кишечной палочки. Ps. fluorescens, штамм № 1 слабо защищает стафилококк от мицетина, а штаммы № 5 и, особенно, № 3 того же вида — хорошо. В присутствии бактерий типа B. radiobacter и штамма № 7 мицетин почти не снижает своих бактерицидных свойств, тогда как в присутствии штамма № 9 наступает почти полная его инактивация.

Из других испытанных микробов защитными свойствами обладают некоторые неспороносные бактерии из группы Achromobacter. У дрожжей, микобактерий, спороносных бактерий мы не обнаружили этих свойств. Как видно, этими свойствами обладает небольшое число видов или штаммов микробов.

Защитными свойствами обладают не только живые клетки бактерий, но и продукты их жизнедеятельности. Полученные фильтраты жидких культур Bacteria sp. шт. № 9 снижают активность мицетина почти так же, как и живая культура. Один кубик фильтрата, прибавленный в 1 см³ раствора мицетина, разведенного 1 : 100 000, полностью инактивирует его.

Следовательно, указанные бактерии выделяют какие-то вещества, инактивирующие мицетин подобно тому, как *p*-амидобензойная кислота инактивирует сульфидин.

Мы не нашли *p*-амидобензойной кислоты в выделениях бактерий, а чистые препараты ее не инактивируют мицетин. Следовательно, найденные нами бактерии выделяют другие вещества с защитными свойствами. Изучение их продолжается.

Наряду с изучением бактерицидности мицетина производится испытание его лечебных свойств. После предварительного испытания на животных мицетин был применен при лечении инфицированных ран в одном из госпиталей. Большинство ранений было осложнено остеомиэлитом, подвергавшимся ранее длительному лечению. Мицетин применялся спиртовой и водный — в растворе для промывки ран и в виде жировой пасты или с сахарным сиропом, которые накладывались на рану. Испытания эти дали в 60% положительные результаты. Раны становились менее гнойными и совсем очищались, гранулировали, уменьшались в размере и заживали. Жировой мицетин давал больше положительных случаев, чем сахарный или водный. В 40% случаев эффекта не наблюдалось. Отрицательного действия мицетина не наблюдалось.

Изучение лечебных свойств мицетина продолжается.

Выводы

1. Изучено бактерицидное действие мицетина — препарата, полученного из культуры Actinomyces violaceus. Он действует бактерицидно на грамположительные и не действует на грамотрицательные бактерии.

2. Чувствительность разных штаммов стафилококков, а равно и стрептококков, микобактерий и микококков различна. Одни штаммы очень чувствительны к мицетину, другие того же вида мало чувствительны.

3. Бактерицидность мицетина проявляется в разных случаях в различной степени. Более активен он в синтетической безбелковой среде, менее — в МПБ, в бульоне с гноем и др.

4. Чувствительность штаммов бактерий к мицетину меняется не только от состава среды, но и от того, находятся ли они в чистой культуре или в смеси с другими микробами. Некоторые бактерии обладают способностью защищать чувствительные микробы от губительного действия мицетина.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 18.XII.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Красильников Н. Лучистые грибки и родственные им организмы. Москва, 1938.
2. Красильников Н. и Кореняко А. Бактерицидное вещество актиномицета. Микробиология, т. XIII, вып. 6, стр. 675, 1939.
3. Красильников Н. и Кореняко А. Мицетин. Отчеты Академии Наук СССР за 1942 год.
4. Waksman S. and Tischler M. The chemical nature of actinomycin etc. J. Biol. Chem., v. 142, p. 519, 1942.
5. Welsch M. Bacteriostatic and Bacteriolytic Properties of actinomycetes. J. Bact., v. 44, p. 571, 1942.

MYCETIN AND ITS BACTERICIDAL PROPERTIES

N. A. Krassilnikov and *A. I. Koreniako*

Summary

1. The bactericidal activity of mycetin, a preparation obtained from Actinomyces violaceus cultures, has been studied. It has a bactericidal effect on grampositive and does not affect gramnegative bacteria.

2. The susceptibility of different strains of staphylococci as well as of streptococci, mycobacteria and mycococci varies greatly. Some strains are highly susceptible to the action of mycetin, while other strains of the same species show a low susceptibility to it.

3. The bactericidal effect of mycetin is manifested to a varying degree under different conditions. It is more active in synthetic media containing no protein, less — in meat peptone broth in broth containing pus etc.

4. The susceptibility of bacterial strains to mycetin varies not only depending on the composition of the medium, but it depends also on that whether they are subjected to its action in pure culture or mixed with other microbes. Some bacteria are able to protect susceptible microbes against the fatal action of mycetin.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

ОБ ОРИЕНТАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ НИТЕЙ В КОЛОНИИ BAC. MYCOIDES

Е. Н. Мишустин и *В. И. Буканова*

Большинство встречающихся в почве разновидностей Bac. mycoides образует на агаровых средах колонии, в которых основная масса бактериальных тяжей имеет изгиб против часовой стрелки (левое вращение). Реже обнаруживаются «изомерные» им штаммы с правым вращением.

Впервые отмеченное явление было указано Neisser [3], а позднее более детально изучено Pringsheim и Langer [4], а также Gersbach [2].

Можно было предполагать, что в агаровой среде имеются какие-то напряжения, влияющие на отклонение растущих тяжей или вправо или влево.

Герсбах пробовал вращать застывающий агар в одной чашке в левую сторону, а в другой чашке в правую сторону, с целью вызвать разнотипное направление векториальных сил в среде. Однако это воздействие, на среду не сказалось на характере роста колоний Bac. mycoides.

Без положительного ответа остался также аналогичный опыт, поставленный в другом исполнении. Небольшую чашку Петри при остывании агара вращали в одну сторону. Эта чашка помещалась затем в другую, большего размера, и расстояние между стенками этих чашек также заливалось агаром при вращении обеих чашек в разные стороны.

Культура Bac. mycoides наносилась в центр маленькой чашки Петри и, постепенно разрастаясь, переходила на агар, налитый в чашке большего размера. Направление вращения тяжей на агаре в обеих чашках было тождественным.

Если на свободной агаровой поверхности делался отпечаток уже выросшей колонии с левыми завитками, то получали зеркальное отражение первичной культуры. Термостатная выдержка такого отпечатка показывала, однако, что дальнейший рост тяжей продолжается с сохранением присущего данной культуре вращения, т. е. штамм Bac. mycoides не делается правым, а остается левым.

Интересно то, что тяжи Bac. mycoides сохраняют направление своего вращения по отношению к поверхности среды. Если МПА, разлитый в чашках Петри, заразить таким образом, чтобы колония левой расы Bac. mycoides развивалась на нижней поверхности среды, прилегающей ко дну чашки, то тяжи здесь будут также вращаться влево по отношению к поверхности агара. При просмотре же чашки сверху будет казаться, что поверхностная колония вращается в одну сторону, а нижняя — в другую.

В опытах Герсбаха попытка изменить направление бактериальных тяжей соответствующим подбором питательных сред оказалась безрезультатной. Сила тяжести, как оказалось, также заметно не влияла на интересующее нас явление.

Морфологически право- и левовращающие штаммы Bac. mycoides, по данным Герсбаха, не отличаются друг от друга. Точно так же им не было обнаружено существенных различий в энергии разрастания

колоний и устойчивости спор. Серологические реакции также подтвердили тождество правых и левых форм Bac. mycoides.

Особенность зеркально-обратных форм Bac. mycoides была изучена Гаузе [1]. В отношении основных свойств своего обмена эти штаммы оказались тождественными обычным левым формам. Вместе с тем они обладали совершенно различными температурными зависимостями роста. Скорость роста левых вариантов повышалась при увеличении температуры, в то время как у правых вариантов отмечалось явление «теплового повреждения», в силу чего кривая температурной зависимости роста получала куполообразную депрессированную форму.

Нам кажется, что выводы Гаузе нельзя обобщать, так как он экспериментировал с ограниченным числом штаммов Bac. mycoides.

При выполнении нашей работы мы встречали формы Bac. mycoides с левым вращением, дававших, однако, явление «теплового повреждения». Таким образом свойство, описанное Гаузе как общее и отличное для правых штаммов, должно быть рассмотрено как частное лишь для некоторых как левых, так и правых вариантов Bac. mycoides.

В общем до сих пор не найдено удовлетворительного объяснения вращению бактериальных тяжей Bac. mycoides на агаровых средах в ту или иную сторону. Прингсгейм и Лангер считают, что здесь могут быть высказаны следующие предположения:

1. Можно допустить, что изгиб нити совершается благодаря неравномерной работе жгутов с обеих сторон нити. Многие штаммы Bac. mycoides, однако, не обладают жгутами, но их нити на агаре тем не менее дают изгиб в какую-либо сторону. К тому же взрослые клетки Bac. mycoides теряют жгуты, а изгиб формируется и в относительно старой части бактериального тяжа.

2. По аналогии с высшими растениями можно предположить, что одна сторона клетки бактерий растет быстрее другой. В таком случае, однако, конец бактериальной нити должен быть изогнут, что не удается отметить на самом деле.

3. Можно предположить, что на изгиб бактериальных нитей действуют продукты обмена, выделяемые самими же клетками. Очевидно, нити негативно хемотропичны по отношению к своим же продуктам обмена. Это мнение подтверждается картиной, имеющей место при встрече выростов двух недалеко лежащих друг от друга колоний Bac. mycoides. Помимо того, что оба встречающиеся конца испытывают известное угнетение, они нередко делают крутой поворот в сторону. Аналогичный, несвойственный тяжам данной культуры Bac. mycoides, изгиб можно получить, нанося на путь разрастающихся колоний какое-либо токсическое вещество.

Как нам кажется, последнее допущение приводит к признанию того, что продукты обмена неравномерно выделяются по обе стороны клетки. Поэтому у одних рас Bac. mycoides вращение тяжа происходит вправо, а у других влево.

Как видно из приведенного материала, до сих пор ничего достоверного о факторах, определяющих изгиб бактериальных тяжей в колонии Bac. mycoides, не известно. Ряд соображений, вместе с тем, заставляет признать, что в основном интересующее нас явление связано с особенностями роста клетки Bac. mycoides на поверхности твердой питательной среды. При существовании интеркалярного роста у бактериальной нити ее изгиб, как нам кажется, возможен лишь в том случае, если одна сторона бактериальных клеток, входящих в состав нити, будет расти в силу тех или иных причин несколько быстрее, чем другая. При микроскопировании края бактериальной колонии нетрудно установить, что лишь в определенных отрезках бактериальной нити клетки особенно сильно изогнуты. Очевидно, здесь мы имеем центры, в которых

проявляются силовые тенденции к изгибу, имеющиеся во всех клетках нити. Это легко себе представить, допустив, что конец нити встречает на своем пути чисто механическое сопротивление среды к продвижению. Она начинает изгибаться, причем этот изгиб резко проявляется в точке, где имеется случайная возможность легкого скольжения в бок.

Способность тех или иных рас Вас. mycoides давать колонии вполне определенной структуры (правые или левые) является наследственно закрепленной и до сих пор ее переделать в экспериментальной обстановке никому не удалось.

Вместе с отмеченным можно сделать заключение, что на изгиб бактериальных нитей в колонии Вас. mycoides существенное влияние оказывает и состав твердой питательной среды. Так, например, еще Прингсгейму и Лангеру удавалось на средах с низким содержанием агара получать колонии Вас. mycoides с почти радиальным расположением тяжей. С повышением процента агара в той же самой среде изгиб бактериальных нитей становился все более и более резко выраженным. Водная пленка на поверхности твердой среды, по мере того как увеличивается концентрация агара, становится все более скудной. При этом, конечно, возрастает чисто механически сопротивление к продвижению разрастающейся бактериальной нити в радиальном направлении. Скольжение верхушечных клеток затрудняется, и нить начинает изгибаться в ту или иную сторону. Направление изгиба определяется теми особенностями развития бактериальной клетки, о которых мы уже говорили выше.

Таким образом интенсивность изгиба бактериальных нитей в колонии Вас. mycoides определяется, по нашему мнению, с одной стороны, неравномерным разрастанием сторон клетки Вас. mycoides, с другой же — свойствами водной пленки, образующейся на поверхности питательной агаровой среды. Ряд наблюдений, о которых мы будем говорить ниже, заставляет признать, что значение имеет не только абсолютная величина водной пленки, но и наличие в ней каких-то векториальных сил, создаваемых компонентами, входящими в состав питательной среды. Значение первого момента устанавливается чрезвычайно просто — подсушиванием среды, разлитой в чашки Петри. Подобное воздействие всегда резко сказывается на их крутизне завитков. Наличие влияния ориентирующих сил водной пленки доказывается тем, что в средах с одинаковым содержанием агара, но отличающихся по своему составу, характер завитков, образуемых тяжами Вас. mycoides, резко меняется. Например, на картофельном агаре колонии Вас. mycoides получаются всегда с сильно изогнутыми тяжами, в то время как на агаровой среде с 0,1% пептона крутизна изгиба или значительно уменьшается, или тяж принимает радиальное направление. В характере возникающих отклонений значительное влияние оказывают особенности того или иного штамма Вас. mycoides.

Описанное нами явление может быть объяснено лишь наличием в водной пленке каких-то векториальных сил, создаваемых компонентами питательной среды. Проверочные опыты показали, что оптические особенности веществ, входящих в состав среды, существенного значения в описанном явлении не имеют. Так, например, если приготовить 0,1% пептонный агар с различным набором углеводов (левулеза, декстроза, сахароза и т. д.), то на всех этих средах, разнящихся лишь по составу сахаров, различные штаммы Вас. mycoides образуют колонии почти тождественного по характеру завитков порядка.

Исходя из изложенных положений, можно было ожидать, что при возникновении в водной пленке сил, противодействующих естественному изгибу бактериальных нитей, эти последние будут развиваться радиально или даже закручиваться в противоположную сторону. В по-

следнем случае энергия воздействия ориентирующих сил среды должна, конечно, превышать силу изгиба, порождаемую неравномерным развитием бактериальной клетки. Другими словами, теоретически следовало ожидать, что на некоторых средах левозавитые формы Bac. mycoides могут быть превращены в зеркально-обратные. Подобная картина нами была обнаружена на некоторых средах при испытании их пригодности для развития Bac. mycoides. Так, на среде, содержавшей 0,1% пептона, 0,1% K_2HPO_4 и 1,5% агара (Архангельского завода), некоторые расы Bac. mycoides давали совершенно бесспорно левое вращение. При увеличении процента агара до 2,5 тяжи становились у одних штаммов неопределенно (радиально) ориентированными или давали у других штаммов вполне отчетливые правые завитки. У известной части штаммов Bac. mycoides увеличение процента агара не сказалось на характере колонии. Объяснение этому явлению можно найти в различной энергии изгиба бактериальной клетки. Если сила изгиба полностью подавляется иначе ориентированными направлениями среды, то структура колонии меняется — форма левовращающая может быть переделана в правовращающую. В случае если неравномерный рост клетки порождает силу, превышающую иначе действующие силы водной пленки, тип колонии остается прежним. При промежуточном положении бактериальные тяжи получают радиальное направление.

При проведении описываемой работы было сопоставлено развитие 75 штаммов Bac. mycoides, выделенных из различных почв, на 3 средах: МПА, пептонном агаре и картофельном агаре. Каждая из этих сред готовилась в 2 вариантах. Первый вариант содержал 1,5% агара, второй 2,5%.

При изготовлении МПА мы пользовались сухой средой инженера Невижина [1], весьма богатой аминокислотами. На агаризованной среде Невижина Bac. mycoides дает более плотные и с менее круто изогнутыми тяжами колонии, чем на обычном МПА.

Пептонный агар готовился на водопроводной воде, в которую вносились 0,1% пептона и 0,1% K_2HPO_4.

При приготовлении картофельного агара 300 г картофеля отваривались в 1 л воды, к профильтрованной среде добавлялся нужный процент агара.

Одновременно приготовленные среды разливались в чашки Петри при температуре среды около 43°. После затвердевания агара на поверхности среды уколом наносились испытуемые штаммы Bac. mycoides. На картофельном 1,5% агаре подавляющее большинство штаммов Bac. mycoides, выделенных из разных почв, относилось к левым формам. Только один штамм, изолированный из московской почвы, дал неопределенно направленные завитки.

Повышение процента агара в картофельной среде в ряде случаев дезориентировало направление бактериальных тяжей. Один штамм (Игарский № 8) образовал даже колонию с правыми изгибами.

На пептонном 1,5% агаре уже значительное число штаммов Bac. mycoides имеет неопределенную ориентацию, а формы, сохранившие левые завитки, были заметно менее круто изогнуты. Вообще следует заметить, что на картофельном агаре образовывались сильно изогнутые бактериальные тяжи.

Внесение в пептонную среду 2,5% агара вызвало массовую перестройку в структуре колоний Bac. mycoides. Большинство штаммов приобретало неопределенную ориентировку тяжей, а в значительном ряде случаев левые формы Bac. mycoides становились правовращающими. Подобная перестройка, конечно, была не наследственной, и при

[1] Данная среда весьма богата аминокислотами и не содержит белка. Она получается гидролизом мясных отходов.

переносе на обычную среду все измененные штаммы Bac. mycoides начинали образовывать свойственный им тип колоний.

Неопределенная ориентация тяжей в колонии Bac. mycoides наблюдалась у значительного числа штаммов при использовании МПА. Увеличение процента агара вызывало возрастание числа подобных форм. Правое вращение получали лишь единичные штаммы Bac. mycoides.

Сводные данные, суммирующие результат только что описанного опыта, приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Направление бактериальных тяжей у колоний Bac. mycoides на разных средах (% штаммов из числа изученных, давших отмеченное вращение тяжей)

Направление тяжей	МПА		Пептонный агар		Картофельный агар	
	1,5%	2,5%	1,5%	2,5%	1,5%	2,5%
Игарские штаммы						
Левое	60	50	50	—	100	90
Правое	—	—	—	40	—	10
Неопределенное	40	50	50	60	—	—
Московские штаммы						
Левое	58	48	53	11	100	79
Правое	—	—	—	36	—	—
Неопределенное	42	52	47	53	—	21
Сумские штаммы						
Левое	25	25	75	75	100	50
Правое	—	25	—	—	—	50
Неопределенное	75	50	25	25	—	50
Самаркандские штаммы						
Левое	81	62	38	19	100	75
Правое	—	—	—	19	—	—
Неопределенное	19	38	62	62	—	25
Фрунзенские штаммы						
Левое	60	21	13	7	100	93
Правое	7	13	21	53	—	—
Неопределенное	33	66	66	40	—	7
Голодностепские штаммы						
Левое	64	64	73	73	82	64
Правое	9	9	9	18	—	—
Неопределенное	27	27	18	9	18	86

Из табл. 1 весьма нетрудно еще раз заключить, что сильная перестройка структуры колонии Bac. mycoides происходила на пептонном агаре, особенно при увеличении процента агара до 2,5.

Все приведенные нами факты наглядно демонстрируют роль поверхностной пленки в ориентации бактериальных тяжей. Как нам кажется, без изложенных выше допущений невозможно объяснить различное направление тяжей Bac. mycoides на средах неодинакового состава, имеющих, однако, тождественный процент агара.

Наша точка зрения может быть также подтверждена весьма простым опытом с подсушиванием поверхности агара. Если взять пептон-

ную среду с 2% агара и после разливки ее в чашки Петри слегка подсушить в сушильном шкафу, то это вызовет у большинства штаммов Bac. mycoides тенденцию к образованию зеркально-обратных завитков. В табл. 2 дан подобный опыт. Для его проведения были использованы три штамма Bac. mycoides, давшие на 1,5% картофельном агаре левые завитки. Два из них на 2% пептонном агаре образовали радиальный рост, а после подсушивания среды их колонии дали правое вращение. Один штамм в этом опыте сохранил на всех средах левый тип колоний.

Описанный факт объясняется, по нашему мнению, тем, что вообще в поверхностной пленке пептонной среды появляются силы, противодействующие нормальному изгибу бактериальной нити. Их проявление усиливается при уменьшении толщины водной пленки, вызванной подсушиванием. Действие повышенных доз агара, конечно, вызывается аналогичной причиной. Между прочим, если среды с 2,5% содержанием агара разливать горячими в чашки Петри, это способствует сохранению обычного для определенного штамма Bac. mycoides направления тяжей. Данное обстоятельство вполне понятно, так как в таком случае на поверхности среды образуется значительная водная пленка.

Таблица 2

Влияние подсушивания агара на направление бактериальных тяжей в колонии Bac. mycoides

№ п/п.	Штамм Bac. mycoides	Агаровая среда, не подсушенная	Агаровая среда, подсушенная
1	Московский № 20	Неопределенное	Правое
2	» № 3	Левое	Левое
3	Игарский № 8	Неопределенное	Правое

Мы уже ранее отмечали, что на ориентации тяжей сказывается не только мощность водной пленки, имеющейся на поверхности среды, но и состав растворенных в ней веществ. На самом деле на 2,5% картофельном агаре наши штаммы давали вполне нормальные колонии, а на 1,5% пептонном агаре (имевшем без сомнения большую водную пленку) большинство исследованных штаммов имело дезориентированные тяжи. Мы не можем указать на силы, возникающие на поверхности агара. Их должны изучить физико-химики, но в данном случае микроорганизмы при своем развитии вскрывают их наличие.

На определенную роль растворимых веществ среды в ориентации структурных элементов колонии указывает и следующий опыт. Если к среде с одинаковым содержанием агара добавить разные дозы пептона, то это будет влиять на направление роста бактериальных тяжей. Материал по одному из подобных опытов приведен в табл. 3 и понятен без

Таблица 3

Влияние концентрации пептона на направление бактериальных тяжей в колонии Bac. mycoides

№ п/п.	Штамм Bac. mycoides	1,5% агара с концентрацией пептона			3% агара с концентрацией пептона		
		0,1%	0,5%	1,0%	0,1%	0,5%	1%
1	Игарский № 11 . . .	Левое	Неопределенное	Неопределенное	Правое	Правое	Неопределенное
2	Московский № 4 . .	»	То же	То же	Неопределенное	Неопределенное	То же

особых объяснений. Каждая раса, конечно, по вполне понятным причинам реагирует на внесение пептона специфично.

Приведенный материал, как нам кажется, представляет известный интерес, способствуя вскрытию причин, влияющих на формообразование колоний у Bac. mycoides.

Выводы

В работе рассмотрены причины, вызывающие изгиб бактериальных нитей в колонии Bac. mycoides. Ряд косвенных доказательств заставляет признать, что в основном данное явление связано с особенностями роста клетки Bac. mycoides на поверхности твердой питательной среды. При наличии интеркалярного роста у бактериальной нити ее изгиб возможен лишь в том случае, если одна сторона бактериальных клеток, входящих в состав нити, будет расти несколько быстрее, чем другая.

Вместе с тем можно сделать заключение, что на изгиб бактериальных нитей в колонии Bac. mycoides существенное влияние оказывает и состав твердой питательной среды. В зависимости от компонентов среды и концентрации агара бактериальные тяжи в колонии Bac. mycoides или перестают закручиваться и начинают расти радиально, или же образуют зеркально-обратные колонии. Таким образом с помощью подбора среды определенного состава левые формы Bac. mycoides могут быть превращены в правые.

По мнению авторов, данное явление объясняется тем, что на изгиб бактериальных нитей определенное влияние оказывают векториальные силы водной пленки, образующейся на поверхности питательной среды. В том случае, если их направление совпадает с изгибом нитей Bac. mycoides, колонии получаются с сильно закрученными завитками. В противном случае имеется или радиальный рост, или формируются колонии зеркально-обратной формы. У некоторых штаммов Bac. mycoides, очевидно, в силу сильного изгиба растущих клеток переделка описанного порядка не удается. На ориентирующие силы водной пленки оптическая конфигурация химических веществ влияния не оказывает.

Переделка структуры колоний под влиянием состава среды наследственно не закрепляется.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 18.XI.194

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаузе Г. Ф. Анализ некоторых физиологических свойств правозавитых и левозавитых форм Bac. mycoides Flügge. Микробиология. т. VII, стр. 529, 1938.
2. Gersbach A. Ueber die Wendigkeit des Kolonieauslaufes des Bac. mycoides («Isomerie» bei Bakterien) Ctbl. Bakt., 1, Abt., Bd. 88, S. 97, 1922.
3. Neisser. Цитировано по Gersbach
4. Pringsheim E. und Langer J. Zur Entwicklungsphysiologie der Kolonien des Bac. mycoides. Ctbl. Bakt. II. Abt., Bd. 61, S. 225, 1924.

ON THE ORIENTATION OF BACTERIAL FILAMENTS IN BAC. MYCOIDES COLONIES

E. N. Mishustin and *V. I. Bukanova*

Summary

The causes producing the bending of bacterial filaments in a colony of Bac. mycoides are discussed in the study. A number of indirect proofs suggests that this phenomenon must depend on the peculiarities of the

growth of Bac. mycoides cells on the surface of solid media. Taking into consideration the interpolar growth of the bacterial filament its bending becomes possible only if one side of the bacterial cells forming the filament grows somewhat faster than the opposite side.

At the same time we are able to come to the conclusion that an essential influence is exerted on the bend of bacterial filaments in a Bac. mycoides colony by the composition of the solid medium on which it is grown. The bacterial filaments in Bac. mycoides colonies either stop bending and begin to grow radially or begin to form inverted as in a mirror colonies depending on the composition of the medium and on the concentration of agar in it. Thus by introducing certain components into the medium one may transform left forms of Bac. mycoides into right ones.

The author is of the opinion that the explanation of this phenomenon is that the bending of bacterial filaments is in a definite way influenced by the vectorial forces of the water film which is formied on the surface of the nutrient medium. If their orientation coincides with the bend of the Bac. mycoides filaments the arising colonies show strongly bent curls. In the opposite case there is a radial growth or mirror inverted colonies are formed. The transformation described above cannot be achieved with some strains of Bac. mycoides evidently due to a very strong bending of their growing cells. The optic configuration of chemical substances does not affect the orienting forces of the water film.

The transformation of the structure of colonies which arises under the influence of the composition of the medium is not transmitted by heredity.

Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the USSR
Moscow

О ХИМИЗМЕ ФИКСАЦИИ АЗОТА АТМОСФЕРЫ АЗОТОБАКТЕРОМ

Продуктивность азотфиксации на разных источниках углерода

М. В. Федоров

Первая гипотеза химизма фиксации азота атмосферы азотобактером была предложена еще Beijerinck [11, 12]. Он высказал предположение, что связывание азота идет через промежуточную стадию азотной кислоты, хотя и не привел доказательств, подтверждающих это предположение. Поэтому гипотеза Бейеринка не получила распространения и вскоре же была оставлена.

Примерно через год была высказана вторая гипотеза Gerlach и Vogel [20], связывавшая фиксацию азота с синтезом аминокислот и белковых веществ. Эта гипотеза поддерживалась Heinze [22] и Lipman [25] на том основании, что в культурах азотобактера образуются растворимые азотистые вещества органического типа, неусваиваемые растением. Однако она также не получила распространения.

Несколько иначе подошел к решению этого вопроса Stoklasa [32, 33]. Он допустил в качестве первичного продукта азотфиксации синильную кислоту, которая в дальнейшем может превращаться в нуклеопротеиды и лецитин, вещества, богатые не только азотом, но и фосфором. Однако автору не удалось получить необходимые доказательства правильности такого предположения.

Вслед за этим появилась гипотеза Loew и Aso [26], допускавшая гидролитическое связывание азота атмосферы по уравнению

$$N_2 + 2H_2O \rightarrow NH_4NO_2.$$

Однако попытки воспроизвести этот процесс при высоком давлении азота не привели к получению заметных количеств указанного продукта. Как показали расчеты Lewis и Randall [24], образование азотистокислого аммония из азота атмосферы и воды возможно только в концентрации 10^{-6} *M* при очень высоком давлении азота.

Почти одновременно с этим возникло предположение, что в качестве первичных продуктов азотфиксации образуются диоксиаммиак и гидроксиламин по следующему уравнению:

$$N_2 + 3H_2O \rightarrow NH(OH)_2 + NH_2OH.$$

Однако эти вещества не были найдены в культурах азотобактера в значительных количествах и не могут считаться доказанными продуктами.

В процессе дальнейших исследований Remy и Rösing [29], а также Kellermann и Smith [23] удалось обнаружить в культурах азотобактера небольшие количества аммиака. Это привело к появлению гипотезы Wieland [36], в основу которой положена схема химической фиксации азота атмосферы Габера, где молекулы азота выступают в качестве акцепторов водорода. Промежуточными продуктами при таком течении процесса могли бы быть, по Вилянду, диимид и гидразин, образующиеся по следующему уравнению:

1) $N_2 + H_2 \rightarrow NH = NH$,
2) $HN = NH + H_2 \rightarrow H_2N - NH_2$,
3) $H_2N - NH_2 + H_2 \rightarrow 2NH_3$.

Гипотеза Вилянда предполагает, что азотфиксирующие бактерии могут направлять освобождающийся при дегидрировании органического вещества водород не к кислороду, а к молекулярному азоту. При каких условиях конкурентом кислорода может выступить азот — остается неизвестным. Поэтому гипотезу Вилянда можно использовать только для объяснения биологической фиксации азота атмосферы в культурах анаэробных бактерий, образующих в процессе брожения водород, что было правильно отмечено Stapp [31], хотя и здесь она мало вероятна.

Более веские доказательства в пользу первичного образования аммиака в культурах Az. agile были приведены Костычевым [2, 3], обнаружившим это вещество в культуре еще до исчерпания источника углерода. На этом основании он предположил, что процесс азотфиксации представляет собой внеклеточную восстановительную реакцию, проходящую следующие этапы:

$$N_2 \left[\begin{array}{c} + \text{активированный водород органического вещества} \end{array} \right] \underset{(N_2\text{-ферменты})}{\overset{\text{I А первичные продукты}}{\rightleftarrows}} NH_3 \underset{\text{дезаминирование}}{\overset{\text{II А — рост}}{\rightleftarrows}} \left[\begin{array}{c} \text{азот органических веществ протоплазмы} \end{array} \right]$$

Однако согласиться с мнением Костычева о внеклеточном образовании аммиака не представляется возможным по следующим причинам: 1) дегидрирование органического вещества должно происходить также за пределами клетки, хотя дегидразы обычно не выделяются наружу при жизни клетки; 2) взаимодействие азота с активным водородом должно происходить в присутствии активного кислорода, что мало вероятно, и, наконец, 3) аммиак может образоваться и за счет мертвых клеток азотобактера, как это показали Meyerhof и Burk [27]. С другой стороны, можно отметить, что в культурах Az. chroococcum не нашли выделяющихся наружу азотистых веществ и в частности аммиака Moler [28], Bonazzi [15] и Миненков [4].

Даже в культурах Az. agile аммиак не был обнаружен Blom [13, 14]. Он нашел в них только небольшие количества гидроксиламина и на этом основании высказал новую гипотезу, по которой первичным продуктом азотфиксации следует признать гидроксиламин. Его образование возможно путем гидратации азота при участии в качестве активатора ферментного железа.

$$1 \left(\text{Органические соединения Fe++} \right) + N \equiv N + 2H_2O \rightarrow (\text{Органическое Fe++}) \; HO.\overset{H}{\overset{|}{N}} - \overset{H}{\overset{|}{N}}.OH$$

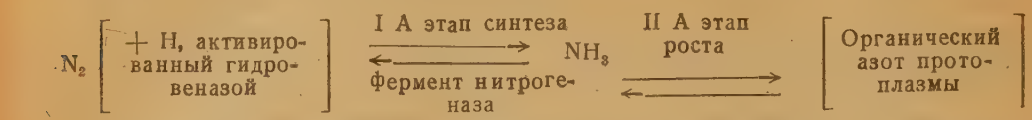
$$2 \left(\text{Органические соединения Fe++} \right) . (HO - \overset{H}{\overset{|}{N}} - \overset{H}{\overset{|}{N}}OH) + 2H^+ \longrightarrow$$

$$\rightarrow \left(\text{Органические соединения Fe+++} \right) + 2NH_2OH$$

Если в отношении кислорода экспериментально доказано участие в процессе железа в качестве активатора, то в отношении азота Блом не привел никаких экспериментальных доказательств. Окись углерода и молекулярный азот не могут быть однотипно реагирующими веществами, способными вытеснять молекулы кислорода с активной поверхности геминного фермента. Кому не известно, что окись углерода, связывая железо дыхательного фермента, вызывает гибель клетки от удушья, а молекулярный азот входит и выходит из живой клетки, не мешая ее окислительной активности. Не нужно быть особенно проницательным, чтобы понимать, что активация кислорода и активация азота связаны с совершенно различными механизмами. Поэтому гипотеза Блома мало вероятна.

Несколько позже Блома вновь были приведены данные в работе

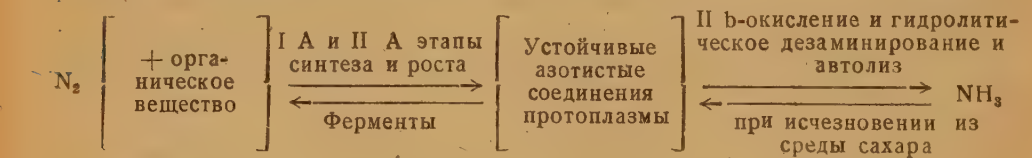
Виноградского [34, 35] о первичном образовании аммиака в культурах азотобактера. На основании своих опытов Виноградский пришел к заключению, что синтез аммиака азотобактером есть процесс энзиматический, идущий по следующей схеме:



Продукция аммиака и его ассимиляция азотобактером, по мнению Виноградского, не связаны между собой нераздельно. Когда происходит задержка ассимиляции, получается избыток аммиака и его диффузия в окружающую среду.

Выделение азотистых продуктов в культурах азотобактера наблюдалось и другими исследователями (Roberg [30], Burk и Horner [17, 18, 19], Andrews [10] и Федоров [6]. В отдельных случаях масштаб выделения был весьма значительным. Среди выделяющихся продуктов обнаруживались аммиак, гидроксиламин, некоторые аминокислоты, флавин, уреаза, коэнзим «R» и другие. Совершенно бесспорно, что большинство этих веществ имеет вторичное происхождение. Весьма возможно, что и аммиак имеет вторичное происхождение, возникая при процессах автолиза, гидролиза или окисления. Эта вероятность подтверждается опытами Бэрка с густыми суспензиями Az. chroococcum и Az. vinelandii. За 100 часов опыта почти половина всего азота клеток азотобактера перешла в аммиачную форму. Хотя Виноградский и указывал, что в опытах Бэрка могла быть инфекция посторонними бактериями, однако вторичное образование аммиака было констатировано и в точных опытах Roberg [30]. Из этого следует, что и схема Виноградского не может считаться вполне обоснованной.

Не разъясняет сути дела и схема Burk [16], тем более, что химический механизм в ней совсем не раскрывается. По этой схеме процесс проходит следующие этапы:



Основываясь на ряде экспериментов, Бэрк предполагает, что процесс азотфиксации осуществляется при помощи ферментного комплекса, активирующего газообразный азот. По его данным, при культуре азотобактера на воздухе весь фермент связан с азотом. Понижение парциального давления азота до 0,5 атм. приводит к освобождению части фермента от азота, а при давлении азота, равном 0,215 атм., фермент насыщен азотом только наполовину и скорость фиксации замедляется. При понижении давления азота до 0,04 атм. преобладающая часть фермента остается ненасыщенной азотом, и фиксация почти прекращается. Так как в этом случае, по данным Работновой [5], Eh в среде выше, чем при полном насыщении фермента азотом (в атмосфере воздуха Eh в культуре Az. chroococcum равен 196 мв, а при давлении азота в 30 мм = + 85 мв), то имеется основание полагать, что между окислительно-восстановительным потенциалом среды и состоянием ферментной системы имеется тесная зависимость. Ослабление азотфиксации приводит к повышению Eh среды.

По расчетам Бэрка, содержание фермента в клетке не превышает 200 000 молекул. Повидимому, он тесно связан с протоплазмой клетки, а потому данные Баха, Ермольевой и Степаниан [1] о способности

фильтрованного сока азотобактера фиксировать азот атмосферы становятся неубедительными, тем более, что и количества фиксированного азота были крайне высокими (на 1 г глюкозы фиксировалось 276 мг аммиачного азота, на что требуется 60 мг водорода, а его содержание в 1 г глюкозы = 66 мг). Справедливость этого мнения подтверждается тем, что, во-первых, Бэрк и Роберг не обнаружили фиксации азота; во-вторых, не было ее и в наших опытах с убитыми замораживанием клетками азотобактера (Федоров [6, 7, 8]). Из изложенного следует, что ни одна из предложенных гипотез химизма азотофиксации пока не только не доказана, но не может даже считаться приемлемой в качестве первого приближения к разрешению этой капитальной задачи, имеющей большое значение не только в общей биологии, но и в практике сельскохозяйственного производства.

Вся сложность проблемы заключается в трудности отделения первого этапа азотфиксации от дальнейших превращений азотистых веществ в протоплазме азотобактера. Методически этот вопрос пока еще не разрешен, а потому и получающиеся экспериментальные данные представляются неубедительными. Решение проблемы требует новых подходов и новых фактов. Как показали наши исследования, на продуктивность азотфиксации может влиять ряд факторов: 1) структура используемого органического вещества; 2) легкость его превращений в процессах дыхания и 3) условия, при которых осуществляется работа ферментного комплекса. По этим направлениям, пока еще не разработанным другими исследователями, мы и ведем экспериментальную работу. В этой статье будут даны материалы только о влиянии структуры органического вещества на продуктивность азотфиксации.

Мы начали свои исследования с определения продуктивности азотфиксации на разных источниках углерода с целью установления, влияет ли структура используемого органического вещества, в частности его насыщенность водородом, на процессы азотфиксации. Для решения этой задачи были поставлены опыты с Az. agile и Az. chroococcum (штамм А). В качестве минеральной питательной среды была использована наша модификация, имеющая следующий состав (в граммах): K_2HPO — 0,5; $CaHPO_4$ — 0,3; $MgSO_4$ — 0,3; K_2SO_4 — 0,2; NaCl — 0,5; FeCl — 0,2; $CaCO_3$ — 5,0; H_3BO_3 — 0,005; $MnSO_4$ — 0,003; $ZnSO_4$ — 0,002; $Al_2(SO_4)_3$ — 0,003; $CuSO_4$ — 0,005; KJ — 0,0005; NaBr — 0,0005; молибденовокислый аммоний — 0,005. Соли растворялись в 1 л дистиллированной воды.

Все опыты ставились в эрленмейеровских колбах Шотта объемом в 300 мл. В каждую колбу наливалось 100 мл минеральной питательной среды и добавлялось 2 г испытуемого органического вещества. По каждому варианту ставились 2 параллельные колбочки. Определение количества потребленного органического вещества и количества фиксированного азота атмосферы производилось в каждой колбе отдельно. Колбы выдерживались после инфекции соответствующей формой азотобактера в термостате при температуре 30°. По окончании опыта культура микроскопировалась для установления ее чистоты и использовалась для химического анализа. В большинстве случаев размеры клеток азотобактера и даже ее внешние очертания были заметно измененными. Как правило в культурах появлялось много мелких форм диплококкового типа; изредка встречались овальные клетки, сцепленные попарно. Много было и крупных диплококков, однотипных с исходной культурой.

Общее содержание азота в культуре определялось по методу Кьельдаля (макроспособ), содержание редуцирующих фелингову жидкость сахаров — по методу Бертрана (полисахариды и дисахариды после гидролиза кислотой), а содержание органических кислот — по раствори-

мому кальцию или другим индивидуализированным приемам. Этиловый спирт определялся по методу Никлю. Результаты анализов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Продуктивность фиксации азота атмосферы Az. chroococcum и Az. agile на разных источниках углерода

№ п/п.	Источники углерода	Az. chroococcum (A)					Az. agile				
		Использовано бактерией за время опыта вещества в г	Фиксировано азота атмосферы, мг				Использовано бактерией за время опыта, г	Фиксировано азота атмосферы мг			
			На 1 г взятого вещества в отд. колбе	На 1 г вещества в среднем	На 1 г-моль вещества	На 1 г водорода вещества		На 1 г вещества в отд. культуре	На 1 г вещества в среднем	На 1 г-моль вещества	На 1 г водорода в веществе
1	Крахмал	1,00	4,9	4,9	—	73,50	1,40	10,6	10,30	—	154,0
		1,10	4,9				1,30	10,0			
2	Декстрин	0,85	4,7	4,45	—	66,75	1,10	12,2	11,20	—	165,7
		1,00	4,2				0,90	10,2			
3	Сахароза	0,70	2,8	2,55	872,1	38,25	2,00	8,5	8,15	2 787,3	129,7
		0,99	2,3				2,00	8,8			
4	Глюкоза	0,80	5,2	5,10	918,0	74,00	2,00	8,8	7,45	1 341,0	111,7
		0,80	5,0				2,00	7,5			
5	Левулеза	1,60	6,0	6,00	1 080,0	90,0	2,00	7,4	7,40	1 332,0	111,0
6	Галактоза	0,95	5,1	5,35	999,0	83,25	2,00	7,85	7,88	1 498,4	118,5
		0,78	6,0				2,00	7,90			
7	Маннноза	0,60	6,6	6,6	—	99,0	1,66	8,5	8,50	—	127,5
8	Раффиноза	—	5,6	5,6	—	—	2,00	6,8	6,8	—	102,0
9	Арабиноза	0,90	4,17	3,99	598,5	59,85	—	—	2,8	420,0	42,0
		0,97	3,80				1,30	2,8			
10	Ксилоза	0,80	2,30	2,35	352,5	35,20	—	—	3,20	480,0	48,0
		0,85	2,40				1,50	3,2			
11	Маннит	2,0	9,0	9,0	1 638,0	117,0	2,00	10,9	11,75	2 138,5	175,5
		2,0	9,0				2,00	12,6			
12	Сорбит	—	3,90	3,90	—	—	—	10,2	10,20	—	—
13	Этиловый спирт	2,00	2,10	2,10	96,6	16,16	2,00	4,15	3,97	182,6	80,8
		2,00	2,10				2,00	3,80			
14	Пропиловый »	2,00	2,2	2,05	123,0	15,1	2,00	3,55	3,55	213,0	26,25
		2,00	1,9				2,00	3,55			
15	Пропионовая кислота	—	2,6	2,6	—	—	—	3,0	3,0	—	—
16	Молочная »	—	4,35	3,95	—	—	1,30	4,6	4,7	423,0	70,5
		—	3,50				1,26	4,8			
17	Пировиноградная	—	2,40	2,40	—	—	—	—	2,3	311,5	77,9
		—	2,40				0,65	2,3			
18	Янтарная кислота	—	4,20	4,30	—	—	0,70	4,75	4,70	554,6	92,4
		—	4.40				0,65	4,65			
19	Яблочная »	—	3,20	3,10	—	—	1,00	3,1	3,10	415,4	69,2
		—	3,00				1,05	3,1			
20	Винная »	—	1,60	1,57	—	—	—	1,85	1,82	—	—
		—	1,45				—	1,80			
21	Лимонная »	—	4,80	5,80	—	—	2,0	6,0	6,05	1 161,6	145,0
		—	6,80				2,0	5,5			
22	Аконитовая »	—	4,80	5,20	—	—	—	4,6	4,60	—	—
		—	5,60				—	4,6			
23	Хинная »	—	9,00	9,00	—	—	2,0	10,4	10,80	2 073,6	172,8
		—	9,00				2,0	11,2			
24	Глицерин	—	—	—	—	—	2,0	11,1	11,50	1 058,0	132,2
		—	—	—	—	—	2,0	11,9			

Как можно видеть из приведенных цифр, продуктивность азотфиксации на разных источниках углерода далеко не одинакова и зависит, повидимому, от структуры органического вещества и запаса имеющейся в нем химической энергии. В самом деле, на всех углеводах, обла-

дающих близкой структурой строения и близким запасом химической энергии, продуктивность азотфиксации колеблется между 7—10 мг на 1 г использованного вещества для культур Az. agile и между 5—7 мг для культур Az. chroococcum. На 1 г-моль приходится от 1 до 2 г связанного азота. Исключение составляют только пентозы. На них продуктивность азотфиксации не превосходит 3—4 мг, что составляет на г-моль около 0,5—0,6 г. Любопытно отметить, что на лактозе азотобактер не растет и азота атмосферы не фиксирует, хотя на продуктах ее гидролиза (галактозе и глюкозе) превосходно развивается и хорошо фиксирует азот атмосферы.

Параллельное сопоставление продуктивности азотфиксации на маннite и сорбите (продукты восстановления углеводов) показало, что восстановление молекулы и увеличение в ней запаса химической энергии приводят к повышению азотфиксации (до 12 мг на 1 г вещества). Близкие результаты получаются и для тех органических кислот, которые стоят близко к углеводам. На лимонной и аконитовой кислотах продуктивность азотфиксации равна углеводам, а в некоторых случаях даже выше, чем на углеводах. Так, например, в культурах Az. chroococcum (штамм А) на этих кислотах было фиксировано 6—7 мг азота, а на галактозе и глюкозе — 3,7—5,0 мг, что на 1 г-моль составит в первом случае 1,2 г, а во втором — 0,9 г.

Из этого следует, что существенное значение для азотфиксации имеет не только богатство органического вещества водородом, но и легкость его дальнейшего окисления в процессах дыхания. Правильность этого мнения подтверждается хотя бы тем, что нам удалось обнаружить весьма высокую продуктивность азотфиксации на хинной кислоте. Это вещество не только хорошо усваивается азотобактером, но дает наиболее высокую азотфиксацию. Так как ее окисление проходит, повидимому, через стадии протокатеховой кислоты и, видимо, пирокатехина и связано с появлением ненасыщенных связей при образовании бензольного кольца, то значение направленности окислительного процесса, а также легкость дегидрирования или же дегидратации, приводящая к образованию ненасыщенных связей, явно выделяется и требует дальнейшей расшифровки. Не исключена возможность, что в момент дегидрирования молекулы органического вещества появляются условия для вхождения азота в молекулу окисляемого органического вещества или же условия, при которых активные формы водорода восстанавливают молекулы азота до аммиака. Какая из этих двух возможностей окажется более реальной, покажут дальнейшие исследования. Так как между запасом химической энергии в используемом веществе и продуктивностью азотфиксации устанавливается тесная зависимость, то не исключена возможность, что реакция связывания азота является эндотермической.

Далее следует отметить, что крайне низкая азотфиксация была обнаружена на этиловом и пропиловом спирте — всего 3,5—4,0 мг на 1 г использованного вещества, что на граммолекулу составит 0,36 г азота. Несравненно выше продуктивность азотфиксации на глицерине (около 12 мг на 1 г). В последнем случае на 1 г-моль приходится около 1,2 г связанного азота, что превышает продуктивность фиксации на этиловом спирте почти в 3,5 раза. Это лишний раз показывает, что дело не только в богатстве органического вещества водородом, но и в легкости дальнейшего окисления этого вещества, в его физико-химических свойствах и в механизме его окисления. Наконец, можно указать, что при сравнении близких по структуре органических кислот (янтарная, яблочная и винная кислота) в качестве энергетического материала для азотфиксации обнаружена также известная закономерность. На янтарной кислоте было фиксировано 4,75 мг на 1 г использованного в опыте вещества, на яблочной — 3,1 мг, а на винной — 1,8—2,15 мг. По мере

Продуктивность фиксации атмосферного азота Az. agile на разных источниках натриевмх

№ п/п.	Источники углерода	Количество вещества в 100 мл среды, г	Использ. вещества бактерией за время опыта, г	Фиксировано азота атмосферы, мг		
				На все вещество в отдельной культуре	На все вещество в среднем	На 1 г-молекулу вещества
1	Глюкоза	3,00 3,00	3,00 3,00	25,0 24,22	24,61	1 476,6
2	Маинит	3,03 3,03	3,03 3,03	25,42 28,35	27,39	1 643,4
3	Глицерин	1,53 1,53	1,53 1,53	17,08 16,10	16,59	995,4
4	Этиловый спирт	0,767 0,767	0,767 0,767	6,63 4,27	5,45	327,0
5	Пропиловый »	1,00 1,00	1,00 1,00	3,90 4,62	4,26	255,6
6	Уксусная кислота	1,00 1,00	1,00 1,00	4,06 4,20	4,13	247,8
7	Гликолевая »	1,27 1,27	1,27 1,27	5,12 5,12	5,43	325,8
8	Молочная »	1,50 1,50	1,50 1,50	9,45 9,00	9,23	553,8
9	Пировиноградная кислота . .	1,47 1,47	1,47 1,47	5,81 6,46	6,14	368,4
10	Янтарная »	1,97 1,97	1,97 1,97	13,16 15,60	14,38	862,8
11	Яблочная »	2,23 2,23	2,23 2,23	7,98 7,97	7,97	478,2
12	Фумаровая »	1,93 1,93	0,71 0,53	8,09 8,19	8,14	488,4
13	Винная »	2,50 2,50	2,50 2,50	8,52 7,96	8,24	494,4
14	Масляная »	1,47 1,47	1,47 1,47	16,04 14,44	15,24	914,4
15	Бензойная »	2,42 2,42	2,42 2,42	23,24 24,66	23,96	1 437,0
16	Хинная »	3,25 3,25	3,25 3,25	27,25 29,45	28,35	1 701,0

Таблица 2

углерода в концентрации $^1/_6$ моля (органические кислотм использованы в форме солей)

Химическая структура вещества	Фиксировано азота атмосферы, мг					Теплота сгорания вещества, ккал.
	На 1 г водорода, содержащегося в веществе	На 1 г водорода радикала (без водорода гидроксила и карбоксила)	На 1 г общего углерода в веществе	На 1 г углерода радикала (без карбоксильной группы)	На 1 ккал химич. энергии использованного вещества	
$CH_2OH(CHOH)_4CHO$	123,0	211,0	20,5	20,5	2,1	674,0
$CH_2OH(CHOH)_4CH_2OH$	117,4	205,4	22,8	22,8	2,2	728,1
$CH_2OHCHOH\ CH_2OH$	124,4	198,0	27,6	27,6	2,05	397,4
CH_3CH_2OH	54,7	60,0	13,6	13,6	1,0	328,0
$CH_3CH_2CH_2OH$	32,0	36,0	7,1	7,1	0,53	484,0
CH_3COOH	61,7	83,0	10,3	20,6	1,18	209,6
$CH_2OH\ COOH$	81,4	162,0	13,6	27,0	2,0	166,8
$CH_3CHOH\ COOH$	92,3	141,0	15,4	23,0	1,70	325,9
$CH_3CO\ COOH$	92,1	123,0	10,2	15,3	1,40	260,0
CH_2COOH | CH_2COOH	143,8	216,0	18,0	36,0	2,40	356,9
CH_2COOH | $CHOH\ COOH$	79,7	160,0	9,97	20,0	1,50	320,1
$CH\ COOH$ || $CH\ COOH$	122,1	244,0	10,17	20,4	1,53	320,3
$CHOH\ COOH$ | $CHOH\ COOH$	82,4	247,2	10,3	20,6	1,8	281,1
$CH_3CH_2CH_2COOH$	114,3	130,0	19,0	25,4	1,75	524,8
C_6H_5COOH	239,6	287,2	17,1	20,0	2,0	772,1
$C_6H_7(OH)_4COOH$	141,8	243,0	20,2	23,6	2,0	845,0

окисления молекулы данных соединений продуктивность азотфиксации падает. Внедрение в молекулу кислорода меняет в ней запас химической энергии и состояние углерода. Азотфиксация при этом явно сокращается, хотя делать окончательные выводы можно будет только после того, как будут осуществлены опыты с легко растворимыми натриевыми солями и с точным учетом потребленной азотобактером кислоты.

Такой опыт нами был поставлен не только с натриевыми солями этих кислот, но и большинства других кислот, использованных в предыдущих опытах. Для того чтобы стандартизовать условия с точки зрения химических требований, предъявляемых к экспериментам подобного рода, все вещества были взяты в концентрации 1/6 моля. Опыт ставился в колбах Эрленмейера на 300 мл. В каждой колбе содержалось 100 мл раствора любого из использованных веществ в концентрации 1/6 моля. Минеральная питательная среда имела тот же состав, что и в предыдущих опытах, но с добавлением фосфатного буфера Зеренсена ($KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$). Во всех вариантах была установлена одна и та же реакция среды (6,83 pH). Количество вводимого буфера колебалось в пределах 5 мл на колбочку, но сильно варьировало отношение между KH_2PO_4 и Na_2HPO_4. После стерилизации в автоклаве все колбы с питательной средой были заражены введением 1 мл суспензии Az. agile (налет бактерий с одной пробирки с косым агаром взбалтывался в 100 мл стерильной водопроводной воды). Опыт продолжался 2 месяца. За этот срок в большинстве вариантов органическое вещество было целиком использовано бактерией, и реакция в среде стала щелочной за счет накопления углекислого натрия. Определения общего азота в культуре дали следующие результаты (см. табл. 2).

Как можно видеть из приведенных цифр, между структурой используемого органического вещества и продуктивностью азотфиксации у Az. agile действительно существует определенная зависимость. Углеводы и близкие к ним соединения (глицерин и др.), легко окисляющиеся в культурах данного организма, дают довольно близкую продуктивность на граммолекулу вещества. Чем более восстановлен продукт, тем, обычно, и более высокая продуктивность азотфиксации на нем (на манните 1 643 мг, на глюкозе — 1 476 мг/г-моль). Внедрение в молекулу вещества дополнительных атомов кислорода дает обратный результат и приводит к сокращению продуктивности азотфиксации, что легко видеть, сравнивая азотфиксацию на янтарной, яблочной и винной кислотах, а также на молочной и пировиноградной кислотах. Однако из этого правила, повидимому, имеются исключения. Так, например, на гликолевой кислоте азотфиксация оказалась выше, чем на уксусной, хотя следовало ожидать обратного. Отсюда следует, что на азотфиксацию влияет не только богатство данного вещества водородом, но и ряд других свойств этого вещества.

Весьма своеобразно ведут себя вещества, содержащие только первичную спиртовую группу (этиловый и пропиловый спирты). Несмотря на богатство их водородом и наличие в них значительного запаса химической энергии, они являются плохими источниками энергии для азотфиксирующей активности азотобактера. С какими особенностями этих соединений связан подобный результат, будет подробно изложено в следующем сообщении. Здесь отметим только, что на пропиловом спирте и масляной кислоте, содержащих близкое количество водорода, азотфиксация весьма различна. На масляной кислоте она в 4 раза выше, чем на пропиловом спирте.

Наконец, следует указать, что совершенно особое положение занимают циклические соединения. На бензойной кислоте продуктивность азотфиксации на 1 г содержащегося водорода по крайней мере в два раза больше, чем на глюкозе, манните или же органических кислотах

с прямой цепью. Еще выше она на хинной кислоте. Поскольку превращение последней связано с образованием бензольных производных, то, видимо, не только дегидрирование, но и дегидратация веществ, связанная с образованием ненасыщенных связей, повышает продуктивность азотфиксации.

Расчеты фиксированного азота атмосферы на 1 г общего водорода в веществе и 1 г водорода радикала (без водорода гидроксильной и карбоксильной группы) дают весьма непостоянные величины и указывают, что точной закономерности здесь не наблюдается. Расчеты фиксированного азота атмосферы на 1 г общего углерода в веществе дают также пестрые результаты и указывают на отсутствие точной закономерности и здесь. Более удовлетворительные результаты получаются при пересчете продуктивности азотфиксации на 1 г углерода радикала (без углерода карбоксила). В большинстве случаев на 1 г углерода радикала фиксировано от 20 до 25 мг азота атмосферы. Меньшая продуктивность получилась только для поверхностно активных веществ типа спиртов. Столь близкая продуктивность азотфиксации на различных источниках углерода показывает, что этот процесс тесно связан с превращениями углерода радикала. Это положение подкрепляется и расчетами продуктивности азотфиксации на 1 ккал. химической энергии использованного вещества. Как можно видеть из табл. 2, в большинстве случаев на 1 ккал фиксируется около 2 мг атмосферного азота, кроме веществ с большой поверхностной активностью. Когда рассматриваешь эти цифры и видишь однотипный результат на самых различных типах соединений, то невольно удивляешься не только точности, с какой этот маленький бактериальный организм использует запас химической энергии, предоставленный в его распоряжение природой, но и тому, как он чувствительно реагирует на физико-химические особенности вещества, в частности на поверхностную активность, сейчас же снижая продуктивность азотфиксации. На основе этих данных весь процесс азотфиксации становится сложным, весьма тесно связанным со всеми процессами превращения веществ в живой протоплазме и требующим иных подходов для его расшифровки.

Выводы

1. Чем более восстановлены однотипные соединения, тем выше на них продуктивность азотфиксации (на глюкозе 1 476 мг на граммолекулу, а на манните — 1 643 мг).

2. Внедрение в молекулу однотипных соединений кислорода почти как правило сокращает продуктивность азотфиксации (на янтарной кислоте 862 мг на граммолекулу, а на яблочной и винной кислоте — 490 мг). Исключение составила только гликолевая кислота. На ней азотфиксация оказалась выше, чем на уксусной кислоте.

3. Циклические соединения (бензойная кислота и хинная кислота) дают наиболее высокую продуктивность азотфиксации. На 1 г водорода радикала на этих продуктах фиксируется в 1,5—2 раза больше азота, чем на глюкозе или же органических кислотах с открытой цепью. Так как на хинной кислоте продуктивность азотфиксации выше, чем на бензойной кислоте, а она окисляется азотобактером через бензольные производные, то дегидрирование вещества или его дегидратация, связанные с образованием ненасыщенных связей, сопровождается повышением продуктивности азотфиксации.

4. Расчеты количества фиксированного азота атмосферы на 1 г общего водорода, на 1 г водорода радикала и 1 г общего углерода дают непостоянные результаты и указывают на отсутствие здесь прямой закономерности. Но зато продуктивность азотфиксации на 1 г углерода радикала (без карбоксильной группы) и на 1 ккал запаса химиче-

ской энергии в веществе дают вполне удовлетворительную количественную зависимость. На 1 г углерода радикала фиксируется от 20 до 25 мг азота, а на 1 ккал — почти точно 2 мг. Из этого следует, что азотфиксация у азотобактера тесно связана с превращениями углерода радикала и, повидимому, является процессом эндотермическим. Больше 2 мг получается для веществ, сильно восстановленных — это влияние водорода.

5. Поскольку на этиловом и пропиловом спирте продуктивность фиксации очень низкая и, видимо, находится в зависимости от их поверхностной активности, то следует полагать, что азотфиксация тесно связана с особыми каталитическими поверхностями в протоплазме клетки.

6. Ассимиляция атмосферного азота является третьим процессом, после дыхания и ассимиляции углекислоты, весьма чувствительно реагирующим на наркотические вещества. Об этом будут даны подробные сведения в следующем сообщении, экспериментальная часть которого уже закончена и обработана. Каталитическая поверхность, участвующая в азотфиксации, оказалась весьма значительной и, повидимому, не обладает ферментными свойствами в их обычном понимании.

Лаборатория микробиологии и физиологии растений Московской сельскохозяйственной академии им. К. А. Тимирязева

Получено 4 XI.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Бах А. Н., Ермольева З. В. и Степаниан М. П. Связывание атмосферного азота при обыкновенной температуре и давлении при посредстве энзимов, извлеченных из азотных бактерий, ДАН, т. 1, вып. 1, стр. 22, 1934.
2. Костычев С., Рыскальчук А. и Швецова О. Биохимические исследования над Az. agile. Тр. Одела с.-х. микробиологии ГИОА, т. 1, стр. 91, 1926.
3. Костычев С. и Шелоумова А. Связывание атмосферного азота и образование аммиака Azotobacter'ом. Изв. АН СССР, стр. 662, 1931.
4. Миненков А. Образование аммиака при связывании молекулярного азота микробом Az. chroococcum. Изв. С.-х. акад. им. Тимирязева, № 3, стр. 116, 1928.
5. Работнова И. Окислительно-восстановительный потенциал среды в связи с усвоением молекулярного азота. Микробиология, т. 10, вып. 5, стр. 526, 1940.
6. Федоров М. В. Биологическая фиксация азота атмосферы и ее значение в с.-х. производстве. Монография, 1942. Печатается (СХГ, 1945).
7. Федоров М. В. Химизм фиксации азота атмосферы азотобактером. Тр. научной конфер. ТСХА, 1944.
8. Федоров М. В. Фиксация атмосферного азота азотобактером и пути использования этого организма в с.-х. производстве. Тр. ТСХА, отдел. вып., 1944 в печати).
9. Aboot E. W. A study of microbiological activities in some Luisianna soils. Luisiana Agr. Exp. Sta. Bull. 194, p. 3, 1926.
10. Andrews W. S. and Gieger M. The effect of association of rye and Austrian winter and of nitrats of soda on nitrogen fixation. J. Amer. Soc. Agr., 30, p. 529, 1938.
11. Beijerinck. Ueber Oligonitrophole Microben. Ctbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 7, S. 561, 1901.
12. Beijerinck u. van Deiden. Ueber die Assimilatton des freien Stickstoffes durch Bakterien. Ctbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 9., S. 3, 1902.
13. Blom J. Hydroxylamin (NH_2OH) als Zwischenprodukt bei de Fixierung Atmosphär-Strokstoff. Biochem. Z, 134, S. 385, 1928.
14. Blom J. Én Versuch die chemischen Vorgänge bei der Assimilation des molekularen Stickstoffs. durch Mikroorganismen zu erklären. Ctbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 84, S. 60, 1931,
15. Bonazzi A. Studies on Azotobacter chroococcum Beijerinçkii. J. Bact, v. 6, p. 331, 1921.
16. Burk D. On the biochemical mechanism of nitrogen fixation by living forms. Biochem. J. (USSR), v. 2, p. 312, 1937.
17. Burk D. and Horner C. Ueber Hydroxylamin, Hidrazin und Amide als Intermedia rodukte bei der N_2-fixation durch Azotobacter. Naturwiss., Bd. 23, S. 259, 1935.

18. Burk D. and Horner C. The production of ammonia by Azotobactet and its relation to the mechanism of nitrogen fixation, Trans. III Intern. Soil Sci. Congr., v. 1, p. 148, 1935.
19. Burk D. and Horner C. The origin and significance of ammonia formed by Azotobacter. Soil. Sc., v. 41, p. 81, 1936.
20. Gerlach M. und Vogel J. Weitere Versuche mit stickstoffbindenden Bakterien. Ctbl. f. Bakt., II Abt, Bd. 9, S. 817, 1902; Bd. 10, S. 636, 1903.
22. Heinze. Über die Stickstoffassimilation durch niedere Organismen. Landw. Jahrb., Bd. 35, S. 889. 1906.
23. Kellerman K. und Smith. The Absence of nitrate formation in cultures of Azotobacter. Ctbl. f. Bakt., II. Abt., Bd., 40. S. 479. 1913.
24. Lewis J. and Randall. Thermodynamics. S. 597, 1923.
25. Lipmann J. Further contributions to the physiologie and morphologie of the Azotobacter groups. Ann. New-Jersey Exp. Sta.; v. 24, p. 217, 1903; v. 25, p. 287, 1904; v. 26, p. 254, 1905.
26. Loew O. and Aso. On changes of availability of nitrogen on soils. Ctbl. f. Bakt., v. 22, S. 452. 1909.
27. Meyerhof O. and Bürk D. Über die Fixation des Luftstickstoffs durch Azotobacter. Z. f. physiol. Chem., Bd. 139, S. 117, 1928.
28. Moler. Ein Beitrag zur Kenntnis der Entbindung dea durch Azotobacter fixierten Stickstoffes. Ctbl. f. Bakt.. II. Abt., Bd. 47, S. 635, 1917.
29. Remy T. and Rösing. Beitrag zur Methodik der bakterialen Bodenuntersuchungen Ctbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 29, S. 36, 1911.
30. Roberg M. Beiträge zur Biologie von Azotobacter.. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 82, S. 65, 1935.
31. Stapp C. Die Stickstoffbindung durch Bacterien. C. R. 1 Congr. Sci. du sol. 1927.
32. Stoklasa J. Über die chemischen Vorgänge bei der Assimilation des elementaren Stickstoffs durch Azotobacter und Radiobacter. Ber. Dtsch. Bot. Ges., Bd. 24, S. 22, 1906.
33. Stoklasa J. Beiträge zur Kenntnis der chemischen Vorgänge bei der Assimilation des elementaren Stickstoffs durch Azotobacter und Radiobacter. Ctbl. f. Bakt., II. Abt. Bd. 21, S. 484. 1908.
34. Winogradsky S. Sur la synthèse de l'ammoniaque par les Azotobactera du sol. Ann. Inst. Pasteur. v. 48 p. 209, 1932.
35. Winogradsky S. Sur l'origine de l'ammoniaque degagé par les fixateurs d'azote. Ctbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 97, p. 399, 1938.
36. Wieland H. Über den Verlauf der Oxydationsvorgänge. Ber. Dtsch. chem. Ges., Bd. 55, S. 3639, 1922.

ON THE CHEMICAL ASPECT OF THE FIXATION OF ATMOSPHERIC NITROGEN BY AZOTOBACTER. THE PRODUCTIVITY OF NITROGEN FIXATION IN THE PRESENCE OF VARIOUS SOURCES OF CARBON

M. V. Fedorov

Summary

1. The more reduced are the compounds belonging to one type the higher is the productivity of nitrogen fixation in their presence (in the presence of glucose it equalizes 1476 mg/g-molecule, in that of mannitol = 1643 mg).

2. The introduction of oxygen into the molecule of compounds belonging to one type reduces almost regularly the productivity of nitrogen fixation (in the presence of succinic acid it equalizes 862 mg/g-molecule, in that of malic or tartaric acid — 490 mg. Only glycolic acid proved an exception to this rule. Nitrogen fixation was higher in its presence that in that of acetic acid.

3. Cyclic compounds (benzoic acid and quinine acid) produce the highest productivity of nitrogen fixation. One and a half to two times more nitrogen is fixed per 1 g of the radical of these compounds in their presence, than in that of glucose or of organic acids with an open chain.

4. The results of calculations of the amounts of atmospheric nitrogen fixed per 1 g of the hydrogen of the radical or per 1 g of total carbon are irregular, thus showing the absence of any direct dependence here. On the other hand the productivity of nitrogen fixation per 1 g of fhe radical's carbon (without the carboxyl group) and per 1 cal of chemical energy stored in the compound shows a fully satisfactory quantitative dependence. About 20--25 mg of nitrogen is fixed per 1 g of carbon of the radical (without the carboxyl group) and almost exactly 2 mg/1 kg. cal. It follows from this that the fixation of nitrogen by the Azotobacter is closely bound with the transformation of the carbon of the radical and is evidently an endothermic process.

5. Since the productivity of nitrogen fixation in the presence of ethyl or propyl alcohol is very low and seems to depend on their surface activity it may be presumed that the fixation of nitrogen is closely bound with speciäl catalytic surfaces in the protoplasm of the cell.

Laboratory of Microbiology and Plant Physiology
of the K. A. Timiriazev Academy of Agriculture
Moscow

ВЛИЯНИЕ РОСТОВЫХ ВЕЩЕСТВ НА АЦЕТОНО-ЭТИЛОВЫЕ БАКТЕРИИ

1. Потребность бактерий в различных витамино-подобных веществах

Н. Д. Иерусалимский и *А. Д. Булаткин*

Несмотря на то, что вопрос о ростовых веществах микроорганизмов вызывает в последние годы громадное число исследований [2], возбудители ацетоно-этилового брожения ускользнули пока от внимания исследователей и потребность их в «факторах роста» осталась неизвестной. Это побудило нас к постановке настоящей работы.

Работа проводилась с 2 штаммами ацетоно-этиловых бактерий: 1) описанным в статье Чумак [3] и 2) выделенным нами заново из гнилого картофеля. Как в отношении морфолого-физиологических признаков, так и в отношении их нуждаемости в ростовых веществах, оба штамма оказались очень похожими. Мы относим их к Bac. acetoethylicus (Northrop [5]).

Основная синтетическая среда состояла из водопроводной воды с добавкой глюкозы или сахарозы (1—5%), мела (1—2%), K_2HPO_4 (0,05%), $MgSO_4$ (0,01%) и NH_4Cl (0,1%). Кроме хлористого аммония в качестве источников азота были испытаны другие аммонийные соли и аспарагин, однако существенной разницы в росте культуры не наблюдалось.

На указанной среде развитие наступало только при внесении большого количества (3% и больше) посевного материала с картофельного затора, но уже в следующем пересеве развития не было. Добавление в среду растительных или животных экстрактов делало ее пригодной для длительного культивирования. Эти обстоятельства свидетельствуют о том, что ацетоно-этиловые бактерии не принадлежат к числу ауксоавтотрофных микроорганизмов (по терминологии Schopfer [7]) и для своего развития нуждаются в каких-то готовых ростовых веществах, содержащихся в натуральных экстрактах.

Были испытаны следующие экстракты: 1) картофельный сок, который мы получали путем отжимания измельченного сырого картофеля с однократной промывкой оставшейся мезги равным объемом воды. Сок соединялся с промывной водой и освобождался от крахмала (декантация) и от белков (автоклавирование после подкисления фосфорной кислотой до pH 4,5—5); 2) экстракт солодовых ростков, получаемый путем их настаивания с водой при 80°, 3) дрожжевой автолизат, приготовленный обычным способом, 4) «гепатин» [1] — спиртовой экстракт печени, освобождавшийся затем от спирта путем выпаривания; 5) «гепатин» львовский [2] — водный экстракт печени.

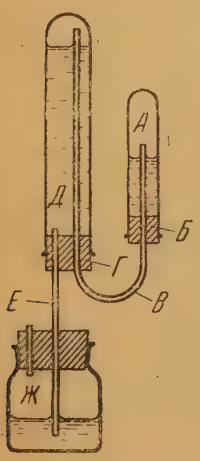
Минимальные дозировки, при которых развитие культуры было еще возможно, выражались (считая на исходный материал) для картофельного сока — 1%, для экстракта солодовых ростков — 0,15%, для дрожжевого автолизата — 0,5%, для харьковского «гепатина» — 1% и для львовского — 0,1%. Следовательно, наибольшей активностью обладали львовский «гепатин» и солодовые ростки.

Такого рода голодные среды с минимальным содержанием экстрак-

[1] Украинского центрального института эндокринологии и органотерапии (Харьков).

[2] Львовский филиал того же института.

тов могут служить фоном для проверки различных ростовых веществ. Как известно, витамины и близкие к ним вещества, с точки зрения их действия на рост микробов, распадаются на 3 группы: 1) вещества, не влияющие на темп размножения, так как микроорганизмы способны сами их синтезировать достаточно быстро; 2) вещества, в отсутствии которых микробы развиваются, но добавка которых ускоряет размножение, так как способность к их синтезу у микробов понижена; 3) вещества, к синтезу которых микроорганизмы не способны и поэтому в отсутствии их вовсе не растут. На фоне упомянутых голодных сред вещества и второй, и третьей групп должны дать один и тот же эффект стимуляции, усиления развития. Для этой цели мы использовали среды с наиболее активными добавками — «гепатином» и экстрактом ростков.



Развитие бактерий мы учитывали различными методами. Для ориентировочных опытов использовался принцип нефелометрии: степень помутнения среды за счет размножения бактерий измерялась путем сравнения со стандартными суспензиями инфузорной земли.

В других случаях интенсивность размножения бактерий учитывалась косвенно, по газовыделению. Для этой цели были использованы простые, но вполне отвечающие своему назначению аппараты, изображенные схематически на рис. 1. В бродильные пробирки *А* емкостью около 10 см³ помещалось по 4 см³ основной среды, зараженной ацетоно-этиловыми бактериями. После добавления туда же по 0,1 см³ простерилизованного раствора того или иного испытуемого вещества, ватная пробка заменялась заранее простерилизованной каучуковой пробкой *Б* с пропущенной через нее изогнутой трубкой *В*. Наружный конец трубки с помощью резиновой пробки *Г* соединялся с градуированной пробиркой *Д* емкостью 25—35 см³, наполненной насыщенным раствором NaCl. Затем вся эта система переворачивалась и с помощью трубки *Е* укреплялась в пробке банки *Ж*. Выделяющийся при брожении газ собирался в пробирке *Д*, вытесняя из нее жидкость, объем собранного там газа измерялся. В случае вытеснения всей жидкости система пробирок *А* — *Д* переворачивалась и *Д* вновь заполнялась раствором соли. И нефелометрический и газовый методы давали близкие результаты.

Приводим список испытанных нами ростовых веществ и их происхождения [1]:

1) Аскорбиновая кислота (витамин С) } из Союзвитаминпрома
2) Рибофлавин (витамин B_2) }
3) Никотиновая кислота (витамин РР)
4) Пиридоксин (адермин, витамин B_6)
5) Тиамин (аневрин, витамин B_1) } от проф. Магидсома (ВНИХФИ)
6) 4-метил-5 β-оксиэтилтиазол (компонент тиамина) } от проф. Магидсома (ВНИХФИ)
7) Дихлоргидрат — 2-метил-4-амино-5-аминометилпиримидин (компонент тиамина) } от проф. Магидсома (ВНИХФИ)
8) β-аланин (компонент пантотеновой кислоты — от проф. Севирина (МГУ)
9) Витамин K_1 — от проф. Кудряшева (МГУ)
10) Мезо-инозит } от проф. Белозерского (МГУ)
11) Урацил } от проф. Белозерского (МГУ)
12) Гетероауксин — от академика Наметкина (МГУ)
13) Концентрат биотина, свободный от витаминов группы В, фирмы S. M. A. Corporation
14) *Р*-аминобензойная кислота — из Украинского н.-и. хим.-фарм. ин-та

[1] Считаем долгом выразить свою благодарность всем лицам, любезно предоставившим нам препараты.

Каждое вещество испытывалось в нескольких концентрациях, по 2—3 пробирки на каждую концентрацию. Опыты повторялись по 2—4 раза.

Из всех испытанных витаминов и близких к ним веществ активными оказались только 4: биотин, тиамин, пиримидин и *p*-аминобензойная кислота. Слабый и не вполне достоверный эффект проявил также витамин K_1. Активность этого витамина для микробов в литературе до сих пор не отмечалась. Остальные вещества никакого влияния не оказывали, а аскорбиновая кислота даже несколько угнетала развитие.

Таблица 1

Добавки в синтетическую среду с 0,15% экстракта солодовых ростков		Газовыделение в % к контролю
Наименование веществ	Количество γ/см³	
Контроль	—	100
Тиамин	0,001	154
	0,01	175
	0,1	209
	1	200
Пиримидин	0,001	111
	0,01	143
	0,1	219
Тиазол	0,01	110
	0,1	95
Биотин	0,0001	130
	0,001	160
	0,01	172
	0,1	168
Парааминобензойная кислота	0,0001	110
	0,001	130

В табл. 1 приведены некоторые средние цифры, показывающие, как упомянутые выше ростовые вещества ацетоно-этиловых бактерий усиливают газовыделение, что в данном случае стоит в прямой связи с ростом бактерий.

Данные табл. 1 так же, как и опущенные здесь нефелометрические данные, показывают, что биотин и *p*-аминобензойная кислота дают максимальный эффект уже в концентрации 0,001—0,01 γ на 1 см³ среды и при дальнейшем увеличении их дозировки стимуляция не усиливается. Тиамин требуется в более высоких дозах — около 0,1 γ на 1 см³. Концентрация выше 1 γ на см³ дает уже некоторое угнетение роста. Активность пиримидина приблизительно совпадает с активностью тиамина. Тиазольная же часть тиамина неактивна.

Представляет интерес отношение ацетоно-этиловых бактерий к тиамину и его компонентам. С точки зрения отношения к этим веществам Robbins [6] делит все организмы на 5 групп, а Schopfer [7], крупнейший исследователь в области биологии тиамина, даже на 8. Между организмами, способными к быстрому синтезу этого витамина и поэтому не реагирующими на его добавление, с одной стороны, и между организмами, которые подобно высшим животным могут расти только при наличии целой молекулы тиамина, с другой стороны, имеется целая гамма промежуточных типов. Здесь есть организмы, способные соединять готовые пиримидин и тиазол в молекулу тиамина, но лишенные возможности их синтезировать; есть и такие, которые обладают способностью к более или менее быстрому синтезу только одного из компонентов — или тиазола, или пиримидина. Ацетоноэтиловые бактерии, повидимому, принадлежат к этому последнему типу.

После того, как было установлено, какие из испытанных витаминоподобных веществ являются «факторами роста» ацетоно-этиловых бактерий, возникло два вопроса: достаточно ли этих веществ для обеспечения развития на синтетической среде и имеются ли кроме испытанных еще какие-нибудь иные вещества, способные усиливать рост бактерий.

Для решения первого вопроса мы испытали рост ацетоно-этиловых бактерий на синтетической сахарно-аммонийной среде с добавкой к ней оптимальных доз ростовых веществ: 0,1 γ/см³ тиамина, 0,01 γ/см³ биотина и 0,001 γ/см³ *p*-аминобензойной кислоты. Оказалось, что на такой среде бактерии нормально размножаются и переходят к спорообразованию даже при внесении минимального количества посевного материала — 0,1% объемных. При последующих пересевах на ту же среду развитие бактерий не ослабевает. Таким образом для существования бактерий достаточно трех ростовых веществ — биотина, *p*-аминобензойной кислоты и тиамина (или одной пиримидиновой части тиамина).

Этим снимается вопрос о существовании каких-то иных ростовых веществ, незаменимых для ацетоно-этиловых бактерий. Но не исключено, что все же могут быть еще другие ростовые вещества, необязательные для бактерий, но ускоряющие их развитие. Чтобы разрешить этот второй вопрос, описанный выше картофельный сок был сгущен в 10 раз, нейтрализован избытком мела, простерилизован, и прозрачная жидкость над осадком мела употреблялась в качестве добавки к синтетической среде с оптимальным содержанием трех ростовых веществ. Количество добавленного сгущенного сока — 0,2 см³ на 4 см³ среды — соответствовало 25% картофельному затору. Этот сок содержал 0,235% азота, поэтому в качестве контроля применялась добавка соответствующих количеств NH_4Cl или гидролизата казеина (свободного от витаминов). Данные одного из опытов показаны в табл. 2.

Таблица 2

Добавки в синтетическую среду с биотином, тиамином и *p*-аминобензойной кислотой	Скорость газовыделения, см³/час				
	от 9 до 24 час.	от 24 до 33 час.	от 33 до 47 час.	от 47 до 56 час.	от 56 до 72 час.
—	0,45	0,29	0,19	0,21	0,23
0,075% гидролизата казеина	0,43	0,17	0,22	0,21	0,18
0,05% NH_4Cl	0,57	0,27	0,19	0,29	0,28
Картофельный сок	1,00	1,09	1,00	0,91	0,46

Таблица 2 показывает, что добавление азота заметного эффекта не производит, тогда как картофельный сок с тем же количеством азота ускоряет более чем в 2 раза газовыделение (а следовательно, и темп размножения). Это нельзя объяснить тем, что вместе с соком вносятся дополнительные количества трех ростовых веществ, так как в основной среде они находятся в оптимальных дозировках, превышение которых уже не дает усиления эффекта. Кстати сказать, по данным Snell и др. [8], в картофеле содержится около 0,01 γ биотина на 1 г, следовательно, вместе с соком было внесено только 0,0025 γ биотина на каждый см³ среды, в то время как концентрация его в основной среде составляла 0,01 γ/см³. Что касается тиамина, то судя по данным, приведенным в книге Букина [1], вместе с соком его было внесено около 0,1—0,2 γ/1 см³, а, как уже говорилось, даже при увеличении его концентрации до 1 γ/см³ никакого дополнительного ростового эффекта не наблюдается. То же самое можно сказать и о *p*-аминобензойной кислоте, содержание которой в растительных объектах невелико

(Landy и Dicken [4]), а ее стимулирующее действие на ацетоно-этиловых бактерий значительно уступает действию биотина и тиамина. Приходится принять, что в картофельном соке содержатся еще какие-то воднорастворимые и термостабильные вещества, ускоряющие рост ацетоно-этиловых бактерий, которые не входят в число испытанных нами 14 витаминов и родственных им веществ.

Выводы

1. Ацетоно-этиловые бактерии не способны к росту на синтетических минерально-сахарных средах, так как нуждаются в ростовых веществах.
2. При испытании 14 различных витаминов и подобных им соединений было установлено, что рост этих бактерий стимулируют следующие вещества: биотин, *p*-аминобензойная кислота и тиамин (витамин B_1) или же одна его пиримидиновая часть. Тиазольная часть тиамина неактивна.
3. Оптимальные дозировки, превышение которых не вызывает дальнейшего усиления ростового эффекта, лежат для биотина и *p*-аминобензойной кислоты около 0,001—0,01 $\gamma/см^3$ и для тиамина — около 0,1 $\gamma/см^3$.
4. На синтетической среде с добавлением оптимальных доз биотина, тиамина и *p*-аминобензойной кислоты бактерии нормально развиваются. Таким образом иных незаменимых для их развития ростовых веществ не существует.
5. Тем не менее, внесение в такую среду картофельного сока вызывает дополнительное усиление развития, которое не может быть объяснено содержащимся в соке азотом. Повидимому, кроме исследованных нами, существуют еще какие-то ростовые вещества, необязательные для бактерий, но стимулирующие их рост.

Институт микробиологии Академии Наук СССР
и
Кафедра микробиологии Московского государственного университета
Москва

Получено 14.XI.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Букин В. Н. Витамины. Пищепромиздат, 1941.
2. Иерусалимский Н. Д. Ростовые вещества микробов. Их природа и значение в жизни микроорганизмов. Микробиология, т. IX, стр. 740, 1940.
3. Чумак М. Д. Изучение нового устойчивого к ацетону штамма ацетоно-этиловых бактерий в связи с возможностью повышения концентраций производственных заторов. Изв. АН СССР, сер. биологич., № 1, стр. 145, 1939.
4. Landy M. and Dicken D. M. A microbiological method for the determination of *p*-aminobenzoic acid. J. Biol. Chem., v. 146, p. 109, 1942.
5. Northrop J., Asche L. and Senior J. Biochemistry of Bac. acetoethylicus. J. Biol. Chem., v. 39, p. 1, 1919.
6. Robbins W. J. Organisms requiring vitamin B_1. Proc. Nat. Ac. Sci., v. 24, p. 53, 1938.
7. Schopfer W. H. Aneurine et héiérotrophie chez les microorganismes. Arch. f. Mikrob., Bd. 9, S. 116, 1938.
8. Snell E. E., Eakin R. E. and Williams R. J. A quantitative test for biotin and observations regarding its occurrence and properties. J. Amer. Chem. Soc v, 62. p. 175, 1940.

THE INFLUENCE OF GROWTH SUBSTANCES ON ACETONE-ETHYLIC BACTERIA.

I. THE NEED OF BACTERIA IN VARIOUS VITAMINLIKE SUBSTANCES

N. D. Jerusalimsky and *A. D. Bulatkin*

Summary

1. Acetone-ethylle bacteria are unable to grow on synthetic media, composed of mineral substances and sugars, because they need special growth substances.

2. Fourteen different vitamins and vitaminlike compounds have been tested and it was found that the growth of these bacteria is stimulated by the following substances: biotin, *p*-aminobenzoic acid and thiamin (vitamin B_1) or its pyrimidine part alone. The thiazole part of thiamin is inactive.

3. The optimal dosages for biotin and *p*-aminobenzoic acid are about 0.001 — 0.01 γ/cm^3 and for thiamin — about 0.1 γ/cm^3. The growth effect is not enhanced by greater concentrations of these substances.

4. The bacteria develop normally in syntbetic media to which optimal doses of biotin, thiamin and *p*-aminobenzoic acid have been added. This shows that there exist no other growth substances indispensable for their development.

5. However, the introduction of potato juice into such a medium causes a further enhancing of their growth which cannot be attributed to the nitrogen contained in the juice. It seems that besides the growth factors tested by us there are some others not obligatory for these bacteria but also stimulating their growth.

Institute of Microbiology of the Academy of Sciences
of the USSR and
Laboratory of Microbiology of the
Moscow State University

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОДУКТОВ АВТОКЛАВНОГО ГИДРОЛИЗА БЕЛКА ДЛЯ АЗОТИСТОГО ПИТАНИЯ ДРОЖЖЕЙ И ПОЛУЧЕНИЯ СИВУШНОГО МАСЛА

И. П. Захаров и *Г. Ф. Назаренко*

Продукты гидролиза белка, аминокислоты, применяются в бродильной практике в виде той естественной смеси, какая имеется в заторах при спиртовом, пивоваренном, дрожжевом и других бродильных производствах. Искусственное введение аминокислот в эти процессы в виде гидролизатов может быть весьма эффективным. Особенно эффективными являются гидролизаты естественных белковых субстратов, к тому же являющихся носителями различных активаторов. По опытам Wagner [9] применение гидролизованной муки земляного ореха и гидролизованного клея дает значительное повышение урожая дрожжей.

В настоящее время является вполне установленным, что дрожжи ассимилируют азот почти всех аминокислот. Согласно Nielsen [6] не ассимилируемым является только азот *dl*-лизина и *dl*-β-аланина.

Различие в степени усвоения различных аминокислот обусловлено главным образом побочным влиянием на дрожжи тех продуктов, которые получаются в результате дезаминирования Thorne [7, 8]. Весьма существенным является также химическая природа и структура аминокислот. Аминокислоты, в которых водород NH_2 замещен метильной группой, совсем не усваиваются дрожжами Illies [5]. Для некоторых аминокислот усвоение азота дрожжами встречается только у одного стереоизомера. Нильсен показал, что азот *dl*-велина, *dl*-серина и *dl*-фениланина ассимилируется дрожжами только наполовину.

К сожалению, более широкому внедрению белковых гидролизатов в практику мешает значительная сложность приготовления их. Обычный способ гидролиза белка большим количеством кислот не может быть рекомендован для получения гидролизатов или аминокислот, когда они требуются в значительном количестве.

В 1923 г. Н. Д. Зелинский и В. С. Садиков впервые провели гидролиз белка под давлением, причем оказалось, что гидролиз белка в этом случае протекает значительно легче, чем открытый гидролиз, и тогда же авторы указали на возможность использования автоклавных гидролизатов белка для питания микроорганизмов. В результате дальнейших работ по автоклавному гидролизу белка, проведенных как советскими исследователями (Зелинский, Садиков, Гаврилов [10, 11], так и иностранными, была создана весьма интересная, так называемая, дикетопиперазиновая теория строения белка. Большая часть продуктов гидролиза белка под давлением при некоторых условиях состоит, согласно работам указанных авторов, из циклических ангидридов аминокислот — дикетопиперазина и его производных.

Как относятся дрожжи и другие микроорганизмы к дикетопиперазину и его производным, остается не выясненным, но ферментное расщепление некоторых дикетопиперазинов считается доказанным.

Расщепление белка в автоклаве под давлением может быть проведено с весьма разнообразными веществами: минеральными кислотами, органическими кислотами, щелочами, щелочными солями, органическими основаниями, спиртами и др. При автоклавном гидролизе белка кислот требуется гораздо меньше, чем при открытом гидролизе, и самый процесс идет гораздо быстрее. В случае гидролиза белка открытым способом серной кислотой последняя применяется в достаточно высокой концентрации (25—30%) и в количестве, в 10 раз иногда превышающем количество белка. Длительность такого гидролиза до 30 часов и более. Гидролиз же белка под давлением 10 атм. ($t = 180°$) проходит в течение 10 часов, если применять 4% серную кислоту. Вследствие меньшего расхода кислоты обработка гидролизата и выделение из него аминокислот значительно облегчаются.

Считая вопрос о применении автоклавных гидролизатов белка в качестве азотистого питания для дрожжей практически очень важным и вместе с тем имея в виду отсутствие каких-либо данных по этому во-

просу в литературе, мы поставили задачей выяснить следующие вопросы:

1. При каких условиях в автоклаве можно провести гидролиз технического препарата белка с наиболее полным превращением в аминокислоты?

2. Можно ли применить автоклавный гидролизат в качестве азотистого питания для дрожжей?

3. Могут ли лейциновые фракции автоклавного гидролизата белка дать повышенные выхода сивушного масла?

1. Гидролиз белка

При некоторых условиях автоклавного гидролиза белка получается значительное количество аммонийных солей. Садиков указывает, что десятиминутный гидролиз кровяного альбумина 4% серной кислотой при 260° дает 50% и при 180° 16,17% аммиачного азота, в течение же 120 минут при 180° его получается 25,3% (образование аммонийных солей является результатом распада продуктов гидролиза под действием высокой температуры и давления). Такое количество аммонийных солей не всегда является желательным, особенно для образования сивушного масла. Доказано Эрлихом [4] и другими исследователями (Залесская [2]), что присутствие в средах аммонийных солей влияет отрицательно на образование сивушного масла дрожжами из лейцина.

Для гидролиза был взят неочищенный технический препарат кровяного альбумина. Этот препарат альбумина представлял порошкообразную массу темнокрасного цвета; содержание общего азота в нем было 14,1%, аммиачного 0,09% и золы 2,5% на воздушно-сухую навеску.

Для получения сивушного масла кровяной альбумин является особенно пригодным вследствие большого содержания в нем лейцина (до 30%) (Захаров и Лешинская [1]).

Колбы с альбумином, хорошо смешанным с семикратным количеством разведенной кислоты, ставились в автоклав; продолжительность гидролиза считалась с момента, когда достигалось намеченное давление.

Гидролизат по отделении твердого остатка подвергался анализу на содержание общего, аминного и аммиачного азота. Определение общего азота производилось по Кьельдалю, аммиака по Фолину и аминного азота по Ван-Слейку.

Из приведенных в табл. 1 данных можно сделать следующие выводы:

1. Степень гидролиза, измеряемая количеством общего и аминного азота, увеличивается с длительностью процесса, также возрастает при этом и содержание аммиачного азота.

2. Для наибольшего образования аминокислот первостепенное значение имеет концентрация кислоты, а не продолжительность гидролиза.

3. Для образования аммиака в автоклавном гидролизе большое значение имеет длительность гидролиза и температуры.

Давление и температура, являясь положительным фактором для накопления продуктов расщепления белка, вместе с тем способствуют и образованию аммиака за счет распада аминокислот, если применять их длительно. Очевидно, непродолжительное автоклавирование с высоким давлением приводит к меньшему накоплению аммиака.

Испытание соляной кислоты (оп. 7) указывает на очень хорошие результаты. Уже на 6% соляной кислоты можно достигнуть 64% накопления аминного азота, содержание аммиачного азота в гидролизате при этом оказалось 11,77% от азота альбумина. Работа с соляной кислотой имеет больше выгод, чем с серной. Так как соляная кислота может быть отделена перегонкой в вакууме, то переработка гидролиза-

Таблица 1

Автоклавный гидролиз кровяного технического альбумина

№№ опытов	Режим автоклава: предварительное нагревание, мин.	до давления атм.	последующее нагревание, мин.	Кислота для гидролиза: концентрация %	концентрация N	Твердый остаток после гидролиза, %	% азота альбумина перешло в раствор в %: всего	аммиачного	аммиачного	определяемого по Ван-Слейку
				H_2SO_4						
1	70	10	120	2	0,41	32,7	53,9	4,61	11,70	16,31
	70	10	120	4	0,82	9,7	85,3	17,02	15,96	32,98
	70	10	120	8	1,63	3,5	88,7	34,32	16,52	50,84
2	180	10	240	2	0,41	23,5	83,7	7,58	15,46	23,04
	180	10	240	4	0,82	7,9	97,1	23,61	18,79	42,40
	180	10	240	8	1,63	3,2	92,5	36,52	19,43	55,95
3	100	10	360	2	0,41	15,1	90,19	12,62	18,65	31,27
	100	10	360	4	0,82	7,9	96,60	24,05	20,14	44,19
	100	10	360	8	1,63	4,2	98,80	40,63	20,92	61,55
4	70	5	240	4	0,82	48,3	56,80	8,72	7,44	16,16
	70	5	240	8	1,63	12,5	87,30	39,14	11,48	50,62
5	150	5	360	8	1,63	9,7	92,5	40,56	12,41	52,97
	150	5	360	12	2,45	8,0	93,8	52,55	11,77	64,32
	150	5	360	16	3,28	6,0	92,3	55,74	12,97	68,71
6	90	10	60	20	4,08	6,4	98,8	54,60	12,26	66,86
	90	10	60	16	3,28	5,8	97,7	54,18	12,69	66,87
	90	10	60	12	2,45	5,2	98,7	53,19	13,68	66,87
				HCl						
7	90	10	60	12	3,33	5,1	—	55,03	13,12	68,15
	90	10	60	8	2,22	4,9	—	—	—	69,85
	90	10	60	6	1,66	6,0	96,3	52,34	11,77	64,11

та белка на аминокислоты значительно облегчается, нейтрализация при этом становится излишней. Дальнейшее упаривание гидролизата в вакууме ведет к получению технического препарата аминокислот.

Выделение лейцина

Для выделения лейцина мы взяли отфильтрованные гидролизаты шести колб 5 и 6-го опытов и соединили их для переработки на аминокислоты вместе. Эти гидролизаты мало отличались друг от друга по своему составу. Гидролизат нейтрализовался баритом до слабокислой реакции по лакмусу. После отделения от сернокислого бария он упаривался на водяной бане. Первым при этом выделялся тирозин. Дальнейшее упаривание вело к выделению лейцина. Было собрано пять отдельных фракций технического лейцина. Выход лейцина был 19,6 г из 90 г альбумина (22%).

Содержание аминного азота в полученных фракциях технического лейцина было высокое 9,3—9,8%. Теоретическое содержание аминного азота в лейцине 10,67%.

2. Применение продуктов автоклавного гидролиза белка для питания дрожжей и получения сивушного масла

В качестве источника азота для образования белка дрожжи используют такие вещества, как аммонийные соли, аминокислоты, пептоны.

Когда дается дрожжам смешанное азотистое питание, то дрожжи отдают явное предпочтение аммонийному азоту, и накопление белков в дрожжевых клетках идет главным образом за счет аммония, если он был введен в среду в достаточном количестве. Использование других видов азотистого питания происходит только тогда, когда запас аммонийного азота почти израсходовался. Эта своеобразная избирательная способность дрожжевого организма в отношении азотистого питания по всей вероятности связана с различной легкостью диссоциации указанных азотистых соединений. Кроме того дрожжевой организм по характеру азотистого питания нужно считать по преимуществу, если можно так выразиться, аммиачным организмом, т. е. потребляющим только аммиак из азотистых соединений при образовании белков.

Использование аммонийных солей дрожжами сводится к отщеплению аммиака и освобождению кислоты из данной соли. Использование аминокислот представляет дезаминирование, т. е. отщепление аммиака и освобождение остатка аминокислот в большинстве случаев в виде спиртов Нужно сказать, что использование цельных молекул аминокислот для построения белков дрожжами большинством исследователей отрицается.

Образование дрожжами спиртов сивушного масла из аминокислот составляет одну из задач обширной проблемы азотистого питания дрожжей. Разумеется, азотистое питание нельзя рассматривать изолированно, вне связи с другими функциями дрожжевого организма: азотистый обмен у дрожжей тесно связан с углеводным обменом не только в процессе построения белкового вещества, но, по всей вероятности, и в процессе спиртового брожения.

Попытки увеличить образование сивушного масла при спиртовом брожении увеличенной дозой лейцина в хлебных заторах не дали положительного результата. Внимательное изучение этого явления показало, что в этом случае дрожжи почти не усваивают лейцина. Образование сивушного масла из лейцина лучше всего происходит в том случае, когда азотистое питание дрожжей при брожении сведено главным образом к лейцину или другим аминокислотам, из которых получаются спирты сивушного масла. По этой причине внесение лейцина в хлебные заторы не дает значительного увеличения выхода сивушного масла, так как в такой среде содержится некоторый запас других азотистых веществ, очевидно, лучше усвояемых дрожжами, чем лейцин. Чтобы превратить лейцин более полно в сивушное масло при работе на естественных средах, нужно в последних снизить содержание питательного азота разведением и внести необходимое для брожения количество ображиваемого углевода.

Мы провели опыты как с цельным гидролизом белка, так и с отдельными фракциями технического лейцина. Чтобы получить нормальное развитие дрожжей и хорошее брожение на средах с гидролизатом или техническим лейцином, мы вносили в них 25% картофельного отфильтрованного сусла от объема бродящей жидкости.

После однократной стерилизации текучим паром в среды вносилась чистая культура XII расы дрожжей в виде водной взвеси, хорошо освобожденной от бражки (одинаковое количество). Брожение проводилось при 30° и контролировалось по углекислому газу. После брожения определялся спирт, сивушное масло и азот.

Таблица 2

Брожение на гидролизате из кровяного технического альбумина (данные на 100 мл)

Спирт	Сивушное масло		Азот общий			Потребление азота, г
	в бражке, г	в спирте, %	до брожения, г	внесенный с гидролизатом, г	после брожения, г	
6,50	0,041	0,62	0,2173	0,184	0,1797	0,0376
6,60	0,041	0,61	0,1253	0,092	0,0941	0,0312
6,40	0,041	0,63	0,1023	0,069	0,0802	0,0221
6,15	0,032	0,52	0,0793	0,046	0,0626	0,0170
5,98	0,032	0,53	0,0333	не вносился	0,0259	0,0074

Опыт с различными количествами гидролизата (см. табл. 2) показал, что внесение гидролизата белка в спиртовое брожение улучшает азотистое питание дрожжей и положительно сказывается на образовании спирта. Потребление азота дрожжами в средах с гидролизатом значительно больше, чем в среде без гидролизата, и спирта получается

тоже больше. Увеличение сивушного масла также имеет место, но в значительно меньшей степени, чем с лейцином.

Технический лейцин брался на брожение в одинаковом количестве (0,3%). Из всех фракций в качестве контроля становилась колба с 0,2% чистого лейцина.

Таблица 3

Брожение на лейцине из кровяного технического альбумина
(данные на 100 мл)

Фракция лейцина	Спирт	Сивушное масло		Аминоазот, определяемый по Ван-Слейку		Потребление аминного азота, г
		в бражке, г	в спирте, %	до брожения, г	после брожения, г	
I	5,92	0,148	2,50	0,0336	0,0137	0,0249
II	5,93	0,142	2,37	0,0403	0,0144	0,0259
III	5,77	0,129	2,32	0,0413	0,0144	0,0271
IV	5,30	0,114	1,97	0,0420	0,0152	0,0263
V	6,03	0,117	1,40	0,0427	0,0149	0,0278
чистый лейцин	5,92	0,127	2,14	0,0308	0,0070	0,0238

Из данных проведенного опыта (см. табл. 3), видно, что технический лейцин, полученный при автоклавном гидролизе кровяного альбумина, является хорошим материалом для образования сивушного масла. Накопление сивушного масла в бражке при введении технического лейцина не меньше, чем на чистом лейцине. Потребление аминного азота оказалось довольно высоким и в близком соответствии с количеством полученного сивушного масла.

Выводы

В изложенной работе мы сделали первый опыт применения продуктов автоклавного гидролиза белка для азотистого питания дрожжей и получения повышенных выходов сивушного масла при спиртовом брожении.

Автоклавный гидролиз белка имеет несомненные преимущества перед открытым способом гидролиза во всех тех случаях, когда требуется массовое количество гидролизованного белкового материала или отдельных аминокислот.

Гидролизованный в автоклаве белок является прекрасным азотистым питанием для дрожжей и может применяться для этой цели. Неочищенный препарат лейцина, выделенный из автоклавного гидролизата, служит вполне подходящим материалом для получения сивушного масла, и применение его может обеспечить высокие выхода сивушного масла. Добавление его в среду при обычном способе ведения брожения дает накопление сивушного масла в 0,15% в среде и до 2,5% в спирте. Но, несомненно, можно получать и большие выхода сивушного масла, если создать условия более интенсивного азотистого обмена в дрожжевом организме.

Всесоюзный научно-исследовательский институт спиртовой промышленности
Москва

Получено 14.XI.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров И. П. и Лещинская Р. И. Образование сивушного масла из технического лейцина. Биохимия, т. 3, вып. 5, стр. 684. 1938.
2. Залесская М. И. Получение повышенных выходов сивушного масла. Микробиология, т. VI, вып. 5, 598, 1937.

3. Садиков В. С., Кристаллинская Р. Г., Линдтвиет-Рысакова Е. В. и Мельникова В. Н. Влияние температурного режима при автоклавном расщеплении белковых веществ на состав гидролизата. Биохимия, 1, вып. 3, стр. 359, 1936.
4. Ehrlich F. Ueber die Bedingungen der Fuselölbildung und ihren Zusammenhang mit den Eiweissaufbau der Hefe. Ber. Dtsch. chem. Ges., Bd. 40, S. 1027, 1907.
5. Illies R. Die Stickstoffassimmilation mit Hefen. Wochenschr. f. Brauer., Bd. 55, S. 405, 1938.
6. Nielsen N. цитир. по J. Inst. Brew. C. R. Labor. Carlsb. Ber. Physiol., Bd. 21, S. 395, 1936.
7. Thorne R. S. W. The assimilation of nitrogen from aminoacids by yeast. J. Inst. Brew., v. XLIII, No 7, p. 288, 1937.
8. Thorne R. S. W. The influence of aminoacid degradation products and some related substances upon yeast growth and fermentation J. Inst. Brew., v. XLV, January 13, 1939.
9. Wagner F. Ueber die Ammoniumsalze und Aminosäuren als Stickstoffquellen der Presshefeerzeugung, Z. Bakt., Bd. 93, S. 359, 1936.
10. Zelinsky N. D. und Gawrilow N. I. Zur Frage. des anhydridartigen Characters des Eiweisstoffe. Biochem. Z., Bd. 11, S. 182, 1927.
11. Zelinsky N. D. and Ssachikow W. S. Ueber die Hydrolyse der Eiweisstoffe mittels verdünnter Säuren, Biochem. Z., Bd. 138, S. 156, 1923.

UTILIZATION OF THE PRODUCTS OF AUTOCLAVE HYDROLYSIS OF PROTEIN FOR THE NITROGEN NUTRITION OF YEASTS AND THE PRODUCTION OF FUSEL OIL

I. P. Zakharov and *G. F. Nazarenko*

Summary

In the present study we report the results of our experiments, the first of this kind, concerned with the utilization of the products of autoclave protein hydrolysis as a source of nitrogen nutrition for yeasts and for obtaining higher fusel oil yields in the course of alcohol fermentation.

Autoclave hydrolysis of proteins presents definite advantages as compared with the open hydrolysis method in every case in which a large quantity of hydrolyzed proteic substance or of individual aminoacids is needed.

Protein hydrolyzed in the autoclave forms an excellent source of nitrogen nutrition for yeasts and may be used for this purpose. The unpurified preparation of leucine obtained from the autoclave hydrolyzate, is a very suitable material for producing fusel oil and its utilization can provide high fusel oil yields. By adding it to the medium under the usual conditions of fermentation a yield of 0.15 per cent ot fusel oil in the medium and of up to 2.5 per cent in the alcohol is achieved. There can be no doubt, however, that still higher fusel oil yields may be reached if conditions for a more intense nitrogen metabolistm in the yeast organism are created.

All-Union Scientific Research Institute
of the Distillery Industry
Moscow

СРЕДЫ УЛУЧШЕННОГО РАЗВИТИЯ БАКТЕРИЙ С ПОЛНОЙ И ЧАСТИЧНОЙ ЗАМЕНОЙ АГАР-АГАРА

А. А. Ворошилова и *Е. В. Дианова*

Проблема ускоренного и наиболее интенсивного развития бактерий возникает при выполнении самых разнообразных работ теоретического, практического, а также и производственного характера.

Жизнь бактерий, как и всякого организма, тесно связана с определенными условиями среды. Только созданием оптимальных условий развития можно добиться наиболее быстрого роста и максимального урожая бактерий. И только обеспечив правильный беспрепятственный обмен между клеткой и внешней средой — жидкой и воздушной (для аэробных организмов), можно ожидать наиболее легкого и полного использования клеткой предоставляемых ей питательных ресурсов. Во всех этих процессах, связанных с поступлением и перемещением веществ в клетке, прежде всего имеет место явление диффузии. Чем легче идет процесс диффузии в окружающей клетку среде, тем лучше снабжение ее питательными веществами и тем легче освобождение ее от продуктов жизнедеятельности.

Какие же питательные среды лучше всего могут удовлетворять этому требованию? Наиболее быстро и беспрепятственно процессы диффузии протекают в жидких средах. Наоборот, в гелевых средах, агаровых и желатиновых, так широко применяемых в бактериологической практике, диффузия кристаллоидов, особенно же коллоидов, протекает более медленно, причем степень замедления зависит от концентрации раствора (von Fürth и Rubanovitsch [3]) и от степени дисперсности коллоидов. Кроме того, скорость диффузии падает (Ермоленко и Левина [1], Песков и Золотарова [8]) с повышением концентрации студня, в связи с уменьшением интермицеллярной жидкости, коллоидно не связанной гелем, через которую и идет диффузия. По исследованиям Ziegler и Bechold'a [9], диффузия в 4% агаре и 20% желатине замедляется на 60% по сравнению с 1% агаром и 5% желатиной.

Нами было проверено определение скорости диффузии в агаре с меньшими концентрациями — от 3% до 0,2%. Определение велось с 0,1 *N* раствором HCl в щелочном агаре с фенолфталеином. Были взяты концентрации агара (с двукратной повторностью), равные 0,2—0,5—1—2—3%. Полученные результаты, изображенные на прилагаемой диаграмме (рис. 1), показывают ускорение диффузии по мере уменьшения содержания агара: в 0,5% агаре скорость диффузии увеличивается на 35—50% относительно скорости диффузии в 3% агаре.

По литературным данным, замедленная диффузия в твердой питательной среде (агаровой и желатиновой) ведет к появлению вокруг растущей на этой среде колонии бактерий зоны, обедненной питательными веществами (Liesegang [6]) и одновременно обогащенной продуктами распада. А недостаток питания и избыток продуктов обмена в зоне растущей колонии, как уже указывалось,

это два наиболее существенных фактора, тормозящих развитие бактерий.

Естественно поэтому предполагать, что снижение концентрации агар-агара должно содействовать ускоренному и наибольшему развитию бактерий. В литературе имеются наблюдения, подтверждающие такое предположение. Так, по данным Olsen'a [7] палочка инфлуенции плохо развивается на среде с 2% агаром и совсем не растет на средах с 3% агаром. Аналогичные результаты были получены Ilzhöfer [4] с менингококком. В опытах Kořínek [5] культура Bact. prodigiosum давала на 1,5% агаре колонии в 5 раз мельче, чем на 0,5%. Но сни-

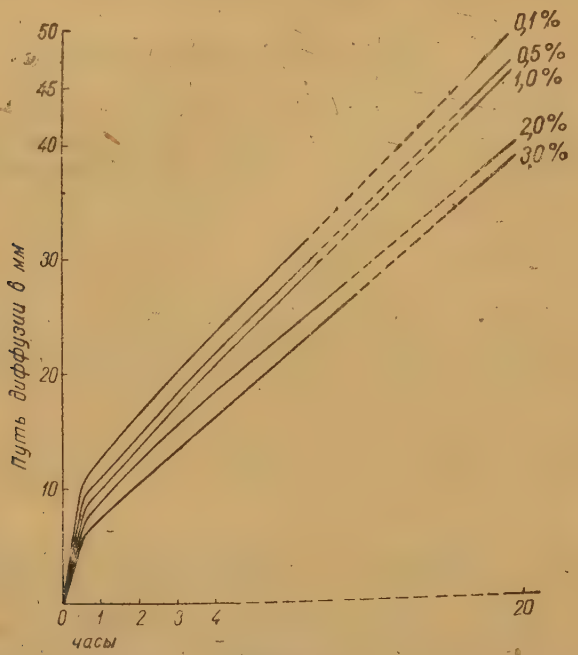


Рис. 1. Скорость диффузии 0,1 *N* HCl (в мм) в агар-агаре различной концентрации

жение процента содержания агара в среде может оказывать положительное действие на развитие бактерий только до определенного предела, обеспечивающего среду в достаточной степени кислородом, т. е. позволяющего развиваться бактериям на поверхности среды. Так, если сопоставить развитие бактерий на твердой среде и на жидкой, то оказывается, что, несмотря на замедленную диффузию питательных веществ в твердых средах, бактериальная продукция на них бывает в 10 и более раз выше, и питательные вещества среды используются полнее, чем в жидкой среде. Ilzhöfer и Angerer [4] постановкой опытов в аэробных и анаэробных условиях показали, что это различие определяется главным образом различием в кислородном снабжении бактерий: тесное соприкосновение бактерий с воздухом на поверхности твердой среды и затрудненный доступ кислорода в толще жидкой среды.

В том случае, когда жидкая среда достаточно обеспечена кислородом, бактериальная продукция в ней сразу повышается. Ilzhöfer и Angerer, выращивая бактерии в тонком слое (в 0,5—1 мл) бульона на поверхности 5 мл бульонного агара в пробирке и одновременно в пробирке с 5 мл одного бульона, получили в первом случае бактериальную продукцию в 2—4 раза выше, чем во втором. Kořínek [5] наблю-

дал в тонком слое жидкости, который получается у края предметного стекла или капилляра, положенного на твердую поверхность агаровой среды, более интенсивное развитие бактерий, чем на поверхности самой агаровой среды.

Все эти наблюдения над влиянием физического состояния среды на размножение бактерий и легли в основу предлагаемых нами «твердых» питательных сред с наполнителями, которые могут быть рекомендованы как среды обогащенного и в некоторых случаях ускоренного роста бактерий. Эти среды (описание помещено в конце статьи) благодаря жидкой или полужидкой фазе облегчают процессы диффузии и в то же время, обладая твердой поверхностью (полужидкая среда с песком, мембранный фильтр на жидкой песчаной среде, бумага с жидкой или полужидкой средой, тонкий слой 2—3% агаровой среды на жидкой среде с бумагой), позволяют выращивать бактерии при свободном доступе воздуха. Мы приводим результаты некоторых наблюдений, проведенных с этими средами, дающие им объективную оценку, как средам более обильного и иногда более быстрого развития бактерий.

Эффективность этих сред учитывалась по времени появления колоний, по их размерам и по количеству бактерий в колонии. Наблюдения проводились с выращиванием бактерий непосредственно на самих средах, а также и на мембранных фильтрах, положенных на эти среды.

За последнее время большинство санитарно-бактериологических исследований воды проводится на мембранных фильтрах. Исследуемая вода отфильтровывается через мембранный фильтр, который вместе с отфильтрованными на нем бактериями помещается на поверхность питательной среды того или другого состава, содержащую 2—3% агар-агара. Колонии развиваются на поверхности фильтра за счет питательных веществ, диффундирующих из агаровой среды. Агар-агар в этой методике служит только твердой подстилкой, причем подстилкой, которая благодаря своей студнеобразной структуре (2—3% агар-агара), замедляет процессы диффузии. Нами была испытана замена агаровой среды жидкой или полужидкой (с 0,3 до 0,5% агара) с одним из наполнителей — с песком, измельченным стеклом, марлей.

Опыты проводились с культурой B. coli. Взвесь этой культуры определенного титра отфильтровывалась через мембранные фильтры в количестве 5—10—15—20 мл. Фильтры помещались в чашке Петри на 3 различные среды: 1) на обычную твердую среду Эндо (с 3% агар-агара), 2) на поверхность наполнителя, пропитанного средой Эндо с 0,2—0,7% агар-агара, и 3) на поверхность тех же наполнителей, пропитанных жидкой средой Эндо совсем без агара. Так как бактериальная урожайность находится в тесной зависимости от количества питательной среды, она вносилась во все среды в равном количестве (Каневская, Зеликина, Павлова, Островская [2]). Следовательно,

Таблица 1

1-й опыт. Размеры колоний B. coli в мм через 24 часа выращивания (на мембранном фильтре)

Характер питательной среды	Обычный 3% агар Эндо	Среда Эндо с 0,7% агара		Среда Эндо с 0,2% агара + + измельч. стекло
		+ песок	+ измельч. стекло	
Размеры колоний	1,0—1,5	3,0—3,5	3,0—3,5	3,0—3,5
Количество выросших колоний на 2 параллельных фильтрах . . .	11 и 9	11 и 8	10 и 10	14 и 6

химический состав среды и абсолютное количество питательных веществ везде было одинаковое. В результате прежде всего бросается в глаза, что колонии на жидких и полужидких средах во много раз крупнее колоний на обычной твердой среде. Это различие не может быть отнесено за счет неравного количества выросших на фильтрах колоний, так как количество колоний на параллельных фильтрах было совпадающее. Для примера приводим несколько измерений колоний, выросших на средах различной плотности.

Таблица 2

2-й опыт. Размеры колоний B. coli в мм через 20 час. выращивания (на мембранном фильтре)

Характер питательной среды	Среда Эндо с 3% агара	Среда Эндо с 0,7% агара		Жидкая среда Эндо			
		+ песок	+ измельч. стекло	+ песок	+ измельч. стекло	+ бумага	+ марля
Размер колоний	0,5—1,0	2,0—3,0	2,0—3,0	2,0—3,0	2,0—3,0	2,0—3,0	2,0—3,0
Количество колоний на фильтре	49	48	50	48	48	42	45

Таблица 3

3-й опыт. Размеры колоний B. coli в мм через 18 час. выращивания на различных средах (на мембранном фильтре)

Среда	Концентрация агар-агара			
	3%		0,75%	
	число колоний	размер колоний	число колоний	размер колоний
Эндо	8	1,25	14	2,0
Левина	9	1,30	14	2,0
Киченко . . .	5	1,25	7	2,25
Шустовой . . .	3	0,75	4	1,25

Таблица 4

Размеры колоний, выросших на твердой среде Эндо и на жидкой Эндо с песком, и количество бактерий в них

Характер питательной среды	Размер колоний, мм	Количество бактерий в колонии
Твердая среда Эндо	0,5	7 700 000
	0,6	9 000 000
Жидкая среда Эндо + песок	1,5	25 000 000
	1,8	31 000 000

Из таблиц видно, что размер колоний, полученных на средах жидкой и полужидкой одного и того же порядка, в 2—4—6 раз превосходит размер колоний, выросших на твердой среде. Сами же бактериальные клетки, как показало их микроскопическое исследование, на всех испытуемых средах имеют один и тот же размер. Разница в величине колоний обусловливается исключительно количеством бактериальных клеток в колонии, в чем убеждает нас учет бактерий в отдельных колониях.

Для подсчета бактерий в колониях отдельная колония осторожно вырезалась стерильными ножницами и вместе с кусочком фильтра помещалась на стенку пробирки, растиралась с помощью запаянного капилляра, сначала в небольшом количестве стерильной воды, чтобы не было комочков бактериальной слизи, а была бы равномерная суспензия, которая затем разбавлялась до определенной концентрации. Разбавленная суспензия высевалась в чашки Петри на М. П. агар-агар. Результаты посева помещаем в табл. 4.

Следовательно, количество бактерий в отдельных колониях на жидкой среде с наполнителем в 3—4 раза больше, чем в колониях на твердой среде. Общая бактериальная продукция, учитываемая количеством бактерий во всех колониях на фильтре суммарно, только в очень редких случаях получалась одинаковой на твердой, полужидкой и жидкой средах, несмотря на то, что количество колоний на фильтре не всегда бывает совпадающее. Обычно же мембранные фильтры на жидкой и полужидкой средах дают бактериальную продукцию в 1½—4 раза большую, чем фильтры на твердой агаровой среде. Для определения бактериальной продукции со всего фильтра через фильтры пропускались равные объемы бактериальной взвеси B. coli. Фильтры помещались на питательные среды — жидкие и с различной концентрацией агара. Через определенные сроки инкубаций с каждой среды снималось по одному фильтру, с которого бактерии смывались точным объемом стерильной воды. Количество бактерий учитывалось посевом на М. П. агар-агар. Результаты сведены в табл. 5.

Таблица 5

Количество бактерий в миллионах в 1 мл смыва со всего мембранного фильтра

№ опыта	Продолжительность инкубаций, час.	М. П. 2% агар-агар	М. П. 0,5% агар + песок	М. П. бульон + песок
23	4	0,0035	0,01	—
	20	163	570	—
24	3	0,00026	0,00033	—
	24	1 650	670	—
25	4	0,0039	0,0022	—
26	20	400	3 400	—
27	20	1 200	3 200	3 800
28	20	2 400	5 000	—
29	4	0,0004	0,00045	0,00044
	20	4 500	7 300	6 700

Такой же результат дает выращивание B. coli не на мембранном фильтре, а на самой поверхности питательных сред твердой и полужидкой в чашках Петри. Для проведения этого опыта бактериальная эмульсия в количестве 1 мл выливалась на поверхность питательных сред. Бактериальная продукция учитывалась через 6 часов и через 24 часа культивирования смывом бактерий с поверхности среды и определением количества бактерий в смыве посевом на М. П. агар-агар.

Сами колонии, выросшие на поверхности среды с 0,5% агара, в 2—3 ½ раз крупнее, чем колонии на обычной среде с 2% агар-агара.

Как видно из этих двух таблиц, в первые часы развития бактерий, когда они одинаково обеспечены питанием как на твердой среде, так и на полужидкой, разница в бактериальной продукции на этих средах незначительная. По мере же развития колоний, в связи с потреблением элементов питания растущими клетками, начинают проявляться отрицательные факторы, связанные с замедленной диффузией в твердой среде, и бактериальная продуктивность на полужидкой среде обгоняет продуктивность на твердой среде. В зависимости

от того, на какой стадии образования колоний наступает этот момент обеднения питательными ресурсами зоны вокруг нарождающейся колонии, мы будем или не будем наблюдать ускоренное появление колоний. Так, колонии B. coli в наших опытах появлялись на жидких

Таблица 6

Бактериальная продукция (B. coli) в миллионах на твердой и полужидкой средах

№ опыта	Продолжительность инкубации, час.	Обычная среда Эндо (с 3% агара)	Полужидкая среда Эндо (0,5% агара + + песок)
35	6	2 760	3 200
	24	20 000	80 000
36	6	12 000	85 000
	24	37 000	173 000

и полужидких средах на 2 часа раньше, чем на твердой среде. У патогенных бактерий B. typhi abdominalis и B. paratyphi «B» наблюдается большей частью одновременное появление очень мелких колоний, но в дальнейшем и у патогенных рост на полужидких средах опережает рост на твердых, так что обследование патогенных бактерий на полужидких средах можно проводить на 4 часа раньше.

При длительном культивировании бактерий на различных средах (твердой, полужидкой и жидкой) колонии их везде будут увеличиваться в размерах до определенного срока. Через 10—14 дней рост прекращается. Но никогда колонии на твердой среде, даже после 14 дней выращивания, не дорастают до размера колоний на жидкой или полужидкой среде; они останавливаются в росте, оставаясь в $1\frac{1}{2}$—$2\frac{1}{2}$ раза мельче колоний на полужидкой среде.

Эта закономерность видна на прилагаемых кривых. Нижняя кривая изображает развитие колонии B. coli на мембранном фильтре на твердой среде, верхняя — развитие колонии также на мембранном фильтре, но на полужидкой среде (рис. 2).

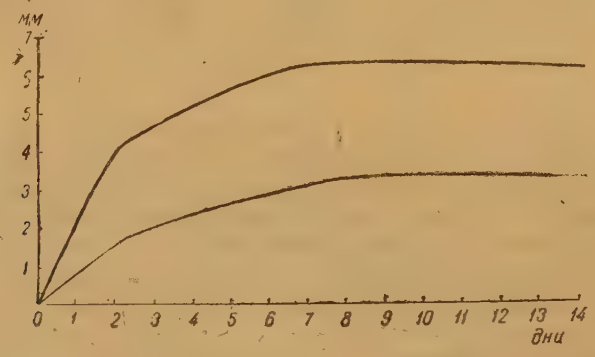


Рис. 2. Развитие колоний на твердой среде и полужидкой с наполнителем (размер колоний в мм, продолжительность роста в днях)

Если колонию, остановившуюся в росте на твердой среде с 3% агар-агара и на полужидкой среде с 0,5% агара, переложить на полужидкую с 0,5% агара, колонии начинают разрастаться. В табл. 7 приведено изменение размера колоний B. coli, которые, после 14-дневного культивирования на мембранном фильтре, достигнув в диаметре 3,3 мм на твердой среде и 6,0 мм на полужидкой, остановились в росте и бы-

ли затем переложены вместе с мембранным фильтром на полужидкую питательную среду. Колонии снова начали увеличиваться в размере.

Такое же наблюдение было проведено и с другими культурами, выращенными как на мембранных фильтрах, так и непосредственно на твердой агаровой среде в чашках Петри. В последнем случае колонии сначала выращивались на поверхности тонкого слоя 3% агар-агара. Через сутки роста одинаковые по размеру колонии вырезались вместе с агаром и перекладывались на свежую питательную среду — одна на полужидкую, другая, параллельная, на твердую (см. табл. 8).

Из приведенных двух таблиц видно, что всякая колония, даже прекратившая рост, будучи переложена на свежую питательную среду, естественно начинает увеличиваться в размерах, разрастаясь за счет новых питательных ресурсов. Но темпы и продолжительность роста на полужидкой среде значительно выше, чем на твердой. Здесь снова сказывается влияние различного физического состояния среды,

Таблица 7

Размер колоний B. coli в мм

С какой среды взята колония	До перемещения на полужидкую среду	Через 30 мин. после перемещения на полужидкую среду	Через 16 час. после перемещения на полужидкую среду	Через 48 час. после перемещения на полужидкую среду
С твердой	3,3	Колония заметно увеличилась	5,5	6,0
С полужидкой	6,0	Колония незначительно увеличилась	8,5 × 9,0	8,5 × 11

Таблица 8

Размер колоний в мм

Культура	На твердой среде до перекл.	После перекладывания					
		на твердую среду, через			на полужидкую среду, через		
		24 ч.	60 ч.	10 дн.	24 ч.	60 ч.	10 дн.
B. coli	2,0	2,5	3,0	3,0	3,5	5,0	5,5
Sarcina flava . . .	1,7	2,0	2,3	2,5	3,3	4,0	5,0
	1,2	1,5	2,0	2,0	3,0	4,0	4,5

обусловливающее в полужидкой среде более легкое поступление питательных веществ к клетке и более полное их использование.

Но помимо ускоренной диффузии улучшенное развитие бактерий на предлагаемых средах можно объяснить еще другими преимуществами жидких и полужидких сред перед твердыми. Жидкая и полужидкая среда обеспечивает возможность более легкого продвижения бактерий по мере их деления в колонии, что облегчает им захват большей питательной площади на поверхности среды. Кроме того, на этих средах легче протекает всасывание межбактериальными капиллярами колонии питательной жидкости из среды. Возможно, что и такие явления, как поверхностное натяжение, адсорбция, определяют в жидких и полужидких средах более благоприятные условия для развития бактерий. Мы не входим сейчас в рассмотрение всех этих явлений, но более близкое ознакомление с ними может указать пути физико-химического воздействия на интенсивность и скорость развития микроорганизмов.

Приготовление «твердых» питательных сред с наполнителями

Для приготовления «твердых» питательных сред с наполнителем берется требуемая питательная смесь в жидком или полужидком виде (с 0,3—0,5% агар-агара) и смешивается с одним из наполнителей. Наполнитель должен быть нейтральным веществом и обладать в достаточной степени капиллярными свойствами. В качестве таких наполнителей можно предложить материал, наиболее легко доступный и не требующий сложной обработки,— кварцевый песок, измельченное стекло, пористые стеклянные пластинки, оберточная бумага, марля и пр.

В зависимости от характера работы можно пользоваться этими средами в различной комбинации их: 1) жидкая среда совсем без агар-агара с наполнителем, 2) полужидкая среда (с 0,3—0,5—0,7% агар-агара) с наполнителем, 3) жидкая среда с наполнителем, с очень тонким слоем полужидкой среды сверху, 4) жидкая среда с наполнителем, с очень тонким слоем обычной твердой среды сверху, и 5) полужидкая среда с наполнителем, с очень тонким слоем обычной твердой среды сверху.

Эти среды могут быть рекомендованы для выполнения самых разнообразных работ — для всех бактериологических работ с мембранными фильтрами, для определения количества бактерий методом разливок, для получения отдельных колоний, для отвивки чистых культур вместо косого агар-агара, для массового выращивания бактерий при изготовлении вакцины и бактериальных удобрений и др. Техника приготовления таких комбинированных сред крайне проста. Приводим ее описание применительно к различным работам.

I. Предварительная обработка наполнителей

1. Песок речной, впервые поступающий в работу, просеивается через сито для освобождения от камешков и посторонней примеси, прокаливается на сковородке на горелке, промывается водопроводной водой взбалтыванием или в струе воды, просушивается на воздухе, в сушильном шкафу или же на сковородке на горелке. При повторном пользовании песком можно ограничиться только одним промыванием его, без прокаливания. Чистый сухой песок насыпается в чашки Петри по 20—30 г (в зависимости от диаметра чашки и от желания получить больший или меньший слой питательной среды). Для жидкой среды лучше брать большую навеску песка, так как ею определяется количество питательной среды; для полужидких сред достаточна навеска в 20—25 г. Чтобы избежать взвешивания песка, можно пользоваться объемной мерой, приспособив для этой цели какой-нибудь стаканчик или мерный цилиндр. Пользоваться одним и тем же песком можно неограниченно долго, обрабатывая его после каждого употребления, как указано выше.

2. Измельченное стекло можно получить из любых осколков лабораторной посуды. Осколки измельчаются в фарфоровой ступке приблизительно до 1—1½ мм частиц. Стеклянная пыль отмучивается, остальная масса промывается кипячением в нескольких водах, чтобы избавиться от щелочности. В остальном со стеклом поступают так же, как и с песком.

3. Пористые стеклянные пластинки осторожно прокаливаются, промываются кипячением в воде, высушиваются и помещаются в чашки Петри.

4. Бумага и марля нарезаются кругами по размеру чашки и складываются в пачки по 6—10 шт. Самый верхний листок бумаги делается большего размера, чтобы образовался борт при помещении его в чашку Петри. Пачки промываются кипячением в воде, отжимаются от избытка ее и укладываются плотно в чашки Петри.

II. Приготовление питательной среды

Наполнители, помещенные в чашки Петри, стерилизуются в печи Пастера, а затем пропитываются жидкой или полужидкой средой. Во избежание запотевания крышек у чашек Петри можно на крышечку с внутренней стороны поместить кусочек фильтровальной бумаги или же, при вынимании чашек из термостата, протереть стерильной ватой запотевшие крышки. Перед пропитыванием питательной средой песка и измельченного стекла последние должны быть рассыпаны ровным слоем по дну чашки. Пропитывая питательной средой бумагу и марлю, надо следить, чтобы между их слоями не оставался воздух, для чего пропитывание лучше вести с какого-нибудь одного края. Питательные среды готовятся по обычной прописи, только агар-агар не добавляется совсем или же берется в слабой концентрации: 0,3—0,7%.

Жидкая питательная среда вносится с таким расчетом, чтобы весь наполнитель был насыщен, но чтобы не было избытка влаги на его поверхности. Для песка и измельченного стекла достаточно взять приблизительно 30—35% жидкой среды от навески стекла и песка, для бумаги — приблизительно 1 мл на каждый листок, для марли — около 2 мл на каждый слой.

Полужидкая среда с 0,3—0,7% содержанием агар-агара вносится в таком количестве, чтобы ею был пропитан не только наполнитель, но чтобы и сверх него был тонкий слой среды по всей поверхности чашки (приблизительно 50—60% среды от навески стекла и песка).

Смешанные среды готовятся из сочетания жидкой или полужидкой среды с твердой. Наполнитель пропитывается жидкой или подужидкой средой, а сверху наливается 4—5 мл горячей твердой среды с любым содержанием агар-агара.

III. Применение питательных сред с наполнителями

1. Все бактериологические работы, выполняемые на мембранных фильтрах, можно проводить, совершенно не употребляя агар-агара, на жидкой питательной среде с наполнителем. Мембранный фильтр с отфильтрованными на нем бактериями помещается в чашку Петри на один из указанных выше наполнителей, который предварительно пропитывается требуемой питательной средой — М. П. бульоном для определения общего количества бактерий, цветной питательной средой для определения бактерий кишечной группы и любой другой элективной средой для выделения и учета различных специфических групп бактерий. Между фильтром и средой не должно быть пузырьков воздуха. Выращивание бактерий проводится, как обычно, в термостате. Питательную среду и воду можно в любой момент пополнить внесением дополнительного количества их.

2. Определение количества бактерий методом разливок можно проводить на бумажной подстилке, пропитанной жидкой питательной средой, на поверхность которой выливается 4—5 мл той же питательной среды с 0,5% агар-агара и испытуемая жидкость.

3. Для получения отдельных колоний распределением испытуемого материала по твердой поверхности среды можно употреблять смешанные среды: бумагу, пропитанную жидкой питательной средой, или песок, предварительно сцементированный средой с 0,2—0,3% агар-агара, на поверхность которых выливается 4—5 мл твердой питательной среды с 2—3% агар-агара. Таким образом получается тонкий поверхностный слой обычной твердой питательной среды на жидкой или полужидкой питательной базе.

4. Для отвивки бактерий вместо агар-агара можно применять полоски бумаги. Бумага фильтровальная, оберточная или любая не вощеная, предварительно вываренная в воде и высушенная, складывается узкими полосками приблизительно в 1 см шириной и 8—9 см длиной (в зависимости от размеров пробирки) в 10 слоев. Один конец закругляется, и этим концом полоски опускаются до самого дна пробирки. В пробирку вносится 1,5—2,0—2,5 мл требуемой питательной среды в жидком виде. Смоченная бумага прижимается стеклянной палочкой вплотную к стенке пробирки, чтобы уменьшить испаряющую поверхность. Приготовленные таким образом пробирки стерилизуются в автоклаве или в аппарате Коха. Можно заготовить впрок простерилизованные в пробирках полоски бумаги и в любой момент, пропитав их жидкой элективной средой, иметь «косой агар» для отвивки культур. Посев делается штрихом по бумаге. Отвитые культуры дают хороший рост, очень хорошо сохраняются в течение длительного срока. Испаряющуюся жидкость и потребленные питательные вещества можно всегда пополнить соответственным добавлением воды или среды. Сдвиги в реакции среды в пробирках можно по мере развития культуры исправлять внесением щелочи или кислоты, чего нельзя сделать, пользуясь настоящим косым агаром.

5. Эти среды очень удобны для опытов с проточными культурами.

Выводы

1. Предлагаемые «твердые» питательные среды с наполнителями могут быть приготовлены из требуемой питательной смеси жидкой или полужидкой (с 0,3—0,5% агар-агара) с добавлением наполнителя. В качестве наполнителя может служить любое нейтральное вещество, обладающее капиллярными свойствами (песок, измельченное стекло, пористые стеклянные пластинки, бумага, марля и пр.).

2. Эти среды можно применять в различной комбинации: а) жидкая среда с наполнителем, б) полужидкая среда с наполнителем, в) жидкая среда с наполнителем и с тонким слоем обычной твердой среды сверху.

3. Применять такие среды можно при работе с мембранными фильтрами, для количественного определения бактерий, для получения отдельных колоний, для отвивки чистых культур вместо косого агар-агара, для массового выращивания бактерий при изготовлении вакцины и бактериальных удобрений для опытов с проточными культурами.

4. Эти среды, обеспечивая ускоренную диффузию питательных веществ к растущей колонии, облегчая продвижение бактерий по поверхности среды по мере их размножения и, возможно, благодаря яв-

лениям поверхностного натяжения и адсорбции создают очень благоприятные условия для развития на них бактерий. Колонии бактерий на этих средах бывают в 2—4—6 раз крупнее и бактериальная продукция в 3—4 раза выше, чем в колониях на обычных твердых средах. Кроме того эти среды дают очень большую экономию агара.

Центральный научно-исследовательский санитарный институт им. Эрисмана
Москва

Получено 8.IV.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермоленко Н. А. и Левина С. Определение коэффициента диффузии электролитов в гелях по данным электропроводности, Коллоидн. журн., т. 5. вып. 6, стр. 487, 1939.
2. Каневская М. Н., Зеликина М. А., Павлова Е. М. и Островская Е. М. Научное обоснование производственных процессов при изготовлении бактериальных вакцин. Сов. врачебн. газета, № 7, 1932.
3. von Fürth O. u. Rubanovitsch F. Untersuchungen über die Diffusion von Electrolyten in Gallerten. Biochem. Z., 90, 265, 1918.
4. Ilzhöfer H. u. Angerer K. Ueber die Bedeutung der Diffusions-vorgänge für das Kolonienwachstum. Arch. f. Hyg., 96, 237, 1926.
5. Kořinek J. Zur Biologie der Bacterienkolonie. Cbl. f. Bakt., Abt. II, 91, 183, 1934.
6. Liesegang R. Ed.. Gegenseitige Wachstumskemmung bei Pilzkulturen. Cbl. f. Bakt. Abt. II, Bd. 51, 850, 1920.
7. Olsen. Cbl. f. Bakt., I. Orig., 84, 504, 1920.
8. Peskoff N. u. Solotarewa S. Ueber die Diffusion von Tanninlösung in Gelatingele. Kolloid. Z., 64, 32, 1933.
9. Ziegler u. Bechold, Z. f. physik. Chem., 56, 108, 1906.

MEDIA IMPROVING BACTERIAL GROWTH AND TOTALLY OR PARTLY SUBSTITUTING AGAR

A. A. Voroshilova and *E. V. Dianova*

Summary

1. The «solid» nutrient media with fillers described may be prepared by adding the filling material to the required liquid or semiliquid (i. e. containing 0.3—0.5 per cent agar) nutrient mixture. Any neutral substance possessing capillary properties (e. g. sand, ground glass, porous glass plates, paper, gauze etc.) can be used as filling material.

2. These media may be used in various combinations: a) liquid medium with filler; b) semiliquid medium with filler; c) liquid medium with filler covered by a thin layer of the usual solid medium.

3. Such media may be recommended for use in work with membrane filters, for bacterial counts, for obtaining colonial growth, for isolating pure cultures instead of agar slants, for mass cultivation of bacteria for purposes of vaccine or bacterial fertilizers production.

4. These media provide most favourable conditions for the growth of bacteria by enhancing the diffusion of nutrient substances towards the growing colony, by facilitating the spreading of bacteria over the surface of the medium as they multiply and possibly also as the result of changed surface tension and adsorption conditions. The colonies of bacteria in such media are 2—4—6 times larger and the numbers of bacteria 3—4 times greater than in colonies grown in usual solid media. Moreover these media permit a quite considerable economy of agar.

Moscow

О СИМБИОТИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЯХ МЕЖДУ ЦЕЛЛЮЛОЗОРАЗЛАГАЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ И АЗОТОБАКТЕРОМ

Ю. М. Штуцер

В существующей литературе, касающейся совместных культур целлюлозоразлагающих бактерий с азотобактером, рассматриваются главным образом условия, которые создаются для азотобактера в присутствии целлюлозоразлагающих бактерий, т. е. рассматривается процесс с точки зрения метабиоза (Pringsheim [8], Koch [7], Tuorila [11], Макринов [2], Dosai [6], Федоров [4].

В отношении симбиоза, т. е. взаимного влияния этих бактерий друг на друга, вопрос до сих пор оставался невыясненным. В немногих работах, касающихся этого, имеются противоречивые результаты (Sanborn and Hamilton [9], Skinner [10]).

Действительные взаимоотношения между целлюлозоразлагающими бактериями и азотобактером могут быть выяснены в том случае, если будут исключены все побочные влияния, т. е. в условиях чистых культур на искусственных питательных средах.

Известны только две такие работы, проведенные с чистыми культурами и имевшие целью выяснить вопросы симбиоза. Это — работа Bucksteeg'a [5] и работа Имшенецкого и Солнцевой (1940). Авторы проводили исследование с Cytophaga Hutchinsonii, не касаясь других видов аэробных целлюлозоразлагающих бактерий. В результате своих исследований они пришли к различным выводам. Так, Bucksteeg считает, что в совместных культурах целлюлозоразлагающих бактерий и азотобактера развитие бактерий наблюдается только до момента исчезновения из среды сахара и азота. Развитие же за счет продуктов жизнедеятельности бактерий не идет.

Имшенецкий и Солнцева приходят к выводу, что азотобактер хорошо развивается за счет продуктов разложения клетчатки целлюлозоразлагающими бактериями, но сам не стимулирует разложения клетчатки, т. е. что между целлюлозоразлагающими бактериями и азотобактером существуют отношения метабиотического характера.

Надо заметить, что опыты в этой работе были сравнительно кратковременными (12 суток). Между тем длительность опыта играет определенную роль, если учесть, что, прежде чем оказать влияние на целлюлозоразлагающие бактерии, азотобактер должен размножаться и проявить свою жизнедеятельность, а это происходит постепенно.

В опытах Рубенчика [3], сообщенных на всесоюзной конференции по сельскохозяйственной микробиологии, приводятся данные о разложении клетчатки Cytophaga за счет аммиака, получавшегося в культуре азотобактера. Методика опыта была аналогичной методике опытов Виноградского, т. е. азотобактер выращивался в чашках Петри, а фильтр, зараженный Cytophaga, находился в крышках.

Наши опыты, касающиеся вопроса взаимоотношений азотобактера и целлюлозоразлагающих бактерий, свелись к следующему: нужно было

выбрать среду для совместных культур целлюлозоразлагающих бактерий и азотобактера. Основная трудность при этом заключалась в том, что для развития этих бактерий нужны различные источники углерода и азота. Для целлюлозоразлагающих бактерий необходим растворимый азот, а в качестве источника углерода им служит клетчатка. Для азотобактера, наоборот, необходимы сахара или спирты, а связанные формы азота задерживают его развитие и останавливают фиксацию азота. Следовательно, ясно, что среда, имеющая оптимальный состав для азотобактера, будет непригодной для целлюлозоразлагающих бактерий.

Нужно было выявить такую комбинацию в среде сахара и азота, при которой происходило бы разложение клетчатки и размножение азотобактера. Для этого было взято пять вариантов среды с различным содержанием сахарозы и KNO_3.

Таблица 1

(В граммах)

№ среды	Вода дистиллированная	K_2HPO_4	KH_2PO_4	NaCl	$MgSO_4$	KNO_3	Сахароза	Мел
I	1 000	0,25	0,25	0,2	0,25	0,5	10,0	5,0
II	1 000	0,25	0,25	0,2	0,25	0,5	5,0	5,0
III	1 000	0,25	0,25	0,2	0,25	—	10,0	5,0
IV	1 000	0,25	0,25	0,2	0,25	1,0	5,0	5,0
V	1 000	0,25	0,25	0,2	0,25	1,0	—	5,0

Так как в культуре сразу начинается потребление азота и сахара, их вредное влияние быстро снимается при тех небольших количествах, в которых они входят в среду. pH среды устанавливался электрометрически и был равен 7,2, а для создания буферности K_2HPO_4 наполовину заменялся KH_2PO_4 и добавлялся мел. Мел при работе с совместными культурами необходим еще и потому, что благоприятно действует на развитие азотобактера; кроме того, с ним образуются нейтральные соли с кислотами, получающимися при разложении клетчатки.

Приводим данные наиболее характерного опыта из ряда повторностей. Опыт ставился в колбах Эрленмейера емкостью по 500 см³. Среды наливалось по 150 см³ и опускались плоенные фильтры, строго одинаковые по весу (1,94 г). Каждая среда выражалась параллельно одним азотобактером и азотобактером с целлюлозоразлагающими бактериями, с соблюдением абсолютной чистоты культуры. Азотобактера вносилось 300 тыс. на 1 см³ среды. В качестве целлюлозоразлагающего микроорганизма была взята культура Cellvibrio vulgaris. До сего времени с Cellivibrio не производилось исследований, между тем он является очень распространенным в торфах и почве. Для совместных культур он удобен тем, что менее чувствителен к присутствию в среде сахара. В течение опыта производилось встряхивание колб. Учет количества азотобактера производился методом высева соответствующих разведений на чашки Петри с агаром Эшби и подсчетом выросших колоний. Таким способом учитывались только живые клетки азотобактера. О развитии Cellvibrio мы судили по разложению им клетчатки, которое отмечалось в соответствующие сроки. О расходовании KNO_3 и сахарозы мы судили по качественным пробам. При этом на 20-е сутки сахара в среде не обнаруживалось.

При рассматривании табл. 2 видно, что размножение азотобактера до максимума идет 10—20 суток, т. е. до исчезновения из среды сахара, после чего титр падает. В совместных культурах с Cellvibrio vulgaris титр везде поднимается после начала разложения бумаги. Рассмат-

Таблица 2

Развитие азотобактера на средах с различным отношением «С» к «N» (в тысячах)

Среда	Условия опыта				Продолжительность опыта, суток						
	заражено	сахароза, %	KNO_3, %	внесено азотобакт.	5	10	20	45	60	90	135
I	Azotobacter	1	0,05	300	10 000	25 000	31 500	2 000	100	130	6
	Azotobacter + Cellvibrio . . .	—	—	300	16 000	78 000	275 000 бумага разлагается	120 000	1 520	2 870	5 185
II	Azotobacter	0,5	0,05	300	2 850	27 500	23 775	7 650	750	530	37
	Azotobacter + Cellvibrio . .	—	—	300	35 300	7 500 бумага нач. разлаг.	43 500	30 000	27 500	1 650	—
III	Azotobacter	1	—	300	2 950	21 500	14 000	15 000	60 000	1 310	275
	Azotobacter + Cellvibrio . .	—	—	300	12 000	23 600	250 000	20 500	470 бумага нач. разлаг.	10 200	50 200
IV	Azotobacter	0,5	0,1	300	13 800	18 000	4 430	1 000	100	10	10
	Azotobacter + Cellvibrio . .	—	—	—	96 800 бумага разложилась	160 000	8 900	800	100	10	1
	Azotobacter	—	0,1	300	1 860	4 438	1 700	1 852	225	820	12
	Azotobacter + Cellvibrio . .	—	—	300	бумага разложилась	3 650	19 922	29 150	30 825	1 300	1

ривая данные по каждой из пяти сред в отдельности, можно сказать, что развитие азотобактера и Cellvibrio в среде зависит от содержания в ней доступных источников углерода и азота.

Среда I с содержанием 1% сахарозы и 0,05% KNO_3. В этой среде деятельность Cellvibrio не проявляется до 20-х суток и бумага не разлагается, так как до этого времени сказывается тормозящее влияние сахара. Однако, по мере того как азотобактер размножается, он потребляет сахар и этим самым снижает его вредное влияние. Таким образом создаются условия для разложения фильтровальной бумаги. Последняя, разлагаясь, становится дополнительным источником углерода для азотобактера, число которого благодаря этому достигает максимума на 20—45-е сутки, составляя 275—120 млн. на 1 $см^3$ среды.

Среда II. Содержит 0,5% сахара и 0,05% KNO_3. За счет сахара сразу начинается размножение азотобактера, титр его на 5-е сутки достигает 35 млн. на 1 $см^3$ среды, но так как количество сахара небольшое, то к 10-м суткам количество азотобактера снижается до 7,5 млн. Однако в это время начинается разложение бумаги, и азотобактер вновь получает возможность размножаться за счет этого источника углерода, вследствие чего и титр его к 20-м суткам вновь поднимается до 43,5 млн.

Из данных таблицы видно, что снижение титра происходит в совместной культуре более медленно, чем в чистой культуре азотобактера. Он резко падает тогда, когда вся бумага оказывается разложенной (90-е сутки).

Среда III. Отличается тем, что содержит 1% сахара и совершенно не содержит азота, т. е. в ней созданы условия для развития одного азотобактера. И действительно, он размножается и количество его достигает к 20-м суткам максимума, а затем, когда сахар весь использован, титр его резко падает — с 250 млн. до 470 тыс. До 60-х суток не замечается никакого разложения бумаги, только потом появляется полоска разъедания на границе с жидкостью. Следовательно, в среде создались условия для развития Cellvibrio, т. е. сахар оказался потребленным азотобактером, а азот появился за счет его жизнедеятельности. После того как бумага начала разлагаться, азотобактер вновь размножается, к 135-м суткам его количество на 1 $см^3$ среды составляет 56,2 млн., а в чистой культуре азотобактера его 275 тыс. Чтобы убедиться, что к этому времени произошло обогащение среды азотом за счет его фиксации, было произведено сжигание субстрата по Кьельдалю, в результате чего определено количество азота в среде, равное 16,59 мг азота, при наличии в исходной 0,28 мг. Исходя из результатов, полученных с этой средой, можно думать, что между азотобактером и целлюлозными бактериями существуют отношения не только метабиотического характера, при которых азотобактер размножается за счет продуктов разложения клетчатки, но также и симбиотического, когда целлюлозные бактерии размножились за счет азота, получающегося в культуре азотобактера.

Среда IV. Содержит 0,5% сахара и 0,1% азота, дает сильное размножение азотобактера за счет сахара и клетчатки, разлагающейся с самого начала. После потребления всего энергетического вещества происходит падение титра.

Среда V. Без сахара, но содержащая 0,1% азота, т. е. в этой среде созданы оптимальные условия для развития целлюлозоразлагающих бактерий. И действительно, бумага начинает разлагаться с самого начала. По мере разложения бумаги в среде появляется доступный азотобактеру энергетический материал и начинается его размножение, доходящее до 30,8 млн. клеток на 1$см^3$ среды. В контроле

количество азотобактера увеличивается очень незначительно за счет следов углеводов, попадающих в среду с фильтровальной бумагой.

В итоге можно сказать, что при наличии в среде клетчатки и целлюлозоразлагающих бактерий азотобактер может размножаться за счет продуктов ее разложения при отсутствии сахара. Вибрион в свою очередь разлагает клетчатку в безазотистой среде за счет азота, получающегося в совместной культуре с азотобактером.

С целью более подробного выяснения результатов взаимного влияния чистых культур целлюлозоразлагающих бактерий и азотобактера, был поставлен ряд опытов.

Опыты ставились на среде V, выбранной из тех соображений, что состав ее был оптимальным для целлюлозных бактерий и, вместе с тем, на ней хорошо развивался азотобактер, получая углеродное питание за счет клетчатки. При этом в каждую колбу было добавлено около 2% (1,82 г) клетчатки в виде фильтровальной бумаги.

При заражении этой среды, разлитой тонким слоем в колбы Эрленмейера, получалось следующее размножение чистой культуры азотобактера и азотобактера совместно с Cellvibrio и с Cytophaga (табл. 3).

Таблица 3

Заражено	Внесено	10 суток	20 суток	30 суток	60 суток
Asotobacter	10 000	402 000	145 000	117 000	55 000
Asotobacter + Cellvibrio	10 000	3 250 000	2 175 000	475 000	100 000
» + Cytophaga	10 000	4 300 000	2 700 000	2 400 000	180 000

Следовательно, в совместной культуре идет интенсивное размножение азотобактера, так как при этих условиях он имеет источник углерода, которого нет в среде без целлюлозоразлагающих бактерий. Некоторое размножение азотобактера в среде без сахара происходит, очевидно, за счет углеводов, которые могли освободиться при стерилизации из фильтровальной бумаги. Если в эту же среду внести сразу большое количество азотобактера, то размножение не произойдет.

Внесено на 1 см³ среды	10 суток	20 суток	30 суток
5 000 000	3 830 000	3 750 000	1 570 000

По окончании срока опыта (60 суток) учитывались количество клетчатки, общий азот и количество целлюлозоразлагающих бактерий.

По количеству оставшейся неразложенной бумаги можно судить об энергии ее разложения при данных условиях. Определение количества клетчатки производилось весовым способом после промывания 10% HCl, многократно дистилированной водой и высушивания до постоянного веса (табл. 4).

Из таблицы видно, что разложение клетчатки происходило интенсивнее в совместной культуре с азотобактером. Следовательно, для целлюлозоразлагающих бактерий здесь создавались более благоприятные условия. Действительно, при учете количества Cytophaga методом разведения по Дюбосу оказалось, что на 60-е сутки количество ее в чистой культуре равнялось на 1 см³ среды в вариантах:

1) Cytophaga . . . . . 10 000 клеток
2) Cytophaga + Azotobacter . . . . . 100 000 000, т. е.

в 10 тысяч раз больше.

Ранее нами предполагалось, что причина лучшего развития целлюлозных бактерий в совместной культуре с азотобактером лежит в улуч-

Таблица 4

Разложение клетчатки в совместной культуре (в граммах)

Заражено	До опыта	После опыта	% разложения
Cellvibrio	1,82	1,53	15,93
Azotobacter + Cellvibrio	1,82	1,32	27,47
Cytophaga	1,82	1,12	38,46
Azotobacter + Cytophaga	1,82	1,00	45,05

шении азотного режима в присутствии азотобактера. Чтобы подтвердить это, в данном опыте было произведено количественное определение общего азота, а также сделаны качественные пробы для определения форм азота и их изменений в среде (табл. 5 и 6).

Таблица 5

Общий азот в среде, мг

Заражено	До опыта	После опыта	% прибавки
Azotobacter	12,46	12,36	—
Azotobacter + Cytophaga	12,46	14,77	18,5
Azotobacter + Cellvibrio	12,46	14,00	10,4
Cytophaga	12,46	12,40	—
Cellvibrio	12,46	12,34	—

Эти данные показывают, что в соответствии с размножением азотобактера произошла и прибыль азота в среде за счет фиксации.

Изменение азотного фона в среде происходило следующим образом (табл. 6).

Таблица 6

Заражена колба со средой	До опыта			10 суток			20 суток			50 суток			65 суток		
	NO_3	NO_2	NH_3	NO_3	NO_2	NH_3	NO_3	NO_2	NH_3	NO_3	NO_2	NH_3	NO_3	NO_2	NH_3
Azotobacter	++ ++	−	−	++ ++	−	−	++ ++	−	−	++ ++	−	−	++ ++	−	−
Azotobacter + Cytophaga	++ ++	−	−	+++	+	−	+++	+	−	+	++	−	+	++ ++	−
Azotobacter + Cellvibrio	++ ++	−	−	+++	+++	−	++ ++	++ ++	−	+	+++	−	−	−	+
Cytophaga	++ ++	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Cellvibrio	++ ++	−	−	+++	+ + +	−	++ ++	++ ++	−	−	−	−	−	−	−

Отсюда видно, что в чистых культурах целлюлозные бактерии, особенно Cytophaga, быстро потребляют весь доступный азот, переводят его в белки своего тела, и размножение после исчезновения растворимого азота прекращается. Азотобактер в среде с нитратами, не находя энергетического материала, постепенно отмирает. Другое дело в совместных культурах. Как видно из табл. 6, здесь до конца опыта имеются в среде доступные для Cytophaga и Cellvibrio формы азота. С течением времени происходит восстановление нитратов в нитриты и затем их исчезновение. В варианте с Cellvibrio начинают обнаруживать-

ся следы аммиака, общее количество азота возрастает по сравнению с исходным.

Микроскопирование содержимого колб показало, что с течением времени на среде без сахара клетки азотобактера мельчают, а затем распадаются, и наблюдается картина их автолиза. В культуре совместно с Cytophaga до конца обнаруживаются делящиеся клетки азотобактера в виде восьмерок, удлиненные подвижные клетки с мелкозернистым содержимым, характерные для нормально развивающейся культуры азотобактера на сахарном агаре Эшби. Наряду с азотобактером встречаются и вегетативные клетки Cytophaga, частично микроцисты. В препаратах из колбы с Cellvibrio + азотобактер картина аналогична той, которая наблюдается в культуре с Cytophaga.

За руководство работой выношу благодарность А. М. Шелоумовой.

Выводы

1. В среде с клетчаткой, не содержащей сахара и имеющей в своем составе небольшое количество азота (0,1% KNO_3), целлюлозные бактерии могут обеспечить азотобактер энергетическим веществом за счет разлагающейся клетчатки.

2. Азотобактер фиксирует азот, размножается за счет продуктов разложения клетчатки и создает благоприятные условия азотного питания для целлюлозоразлагающих бактерий.

3. Между азотобактером и целлюлозоразлагающими бактериями существуют отношения симбиоза.

Всесоюзный институт
с.-х. микробиологии

Получено 17.II.1943

ЛИТЕРАТУРА

1. Имшенецкий А. и Солнцева Л. Симбиоз целлюлозных и азотофиксирующих бактерий. Микробиология, т. IX, вып. 9—10, стр. 7, 8, 9, 1940.
2. Макринов И. Размножение Azotobakter'a и накопление азота при распаде растительных остатков. Архив биологич. наук, XXXIII, вып. 3—4, стр. 367, 1933.
3. Рубенчик Л. Взаимоотношения между азотобактером и некоторыми другими почвенными бактериями. Всесоюзная конференция по с/х микробиологии. Микробиология, т. X, стр. 319, 1940.
4. Федоров М. Влияние азотобактера на азотный баланс почвы и урожай с-х растений при удобрении почвы соломой. Микробиология, т. IX, вып. 6, 1940.
5. Bucksteeg. Zur Frage der simbiotischen Beziehungen zwischen Zelluloseersetzenden und Stickstoffbindenden Bakterien. Ctbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 95, № 1/4, S. 1, 1936.
6. Desai. The influence or green manure and organic residues on nitrogen fixation in soil. The Ind. Journ. of Agric. Sc., v. III, part II, p. 301, 1933.
7. Koch A. Ueber Luftstickstoffbindungen im Boden mit Hilfe von Zellulose als Energiematerial. Ctbl. f. Bakt., II. Abt., 27, № 1/3, S. 1, 1910.
8. Pringsheim H. Weiteres über Verwendung von Cellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffs. Ctbl. f. Bakt., II. Abt., 26, S. 222, 1910.
9. Sanborn I. and Hamilton W. The influence of Azotobacter Chroococcum upon the physiological activities of Cellulose destroyers. Journ. of Bact., XVIII, № 3, p. 169, 1929.
10. Skinner C. An explanation of the action of the so-called accessory substances in the association of Azotobacter and cellulose decomposing organism. Journ. of Bact., XIX, № 3, p. 149, 1930.
11. Tuorila. Zellulose als Energiequelle für freilebende Stickstoffbindende Microorganismen. Ctbl. f. Bakt., II. Abt., 75, S. 178, 1928.

ON THE SYMBIOTIC RELATIONS BETWEEN CELLULOSE-DECOMPOSING BACTERIA AND AZOTOBACTER

J. M. Stuzer

Summary

1. In a medium containing cellulose but no sugar and having in its composition small quantities of nitrogen (0,1 per cent of KNO_3) cellulose bacteria are able to supply Azotobacter with energy producing substances from cellulose which is decomposed by them.

2. Azotobacter fixes the nitrogen, proliferates at the expense of the products of cellulose decomposition and creates favourable conditions for the nutrition of cellulose-decomposing bacteria.

3. The relations between the Azotobacter and the cellulose-decomposing bacteria are those of symbiosis.

The All-Union Institute of
Agricultural Microbiology
Moscow

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

А. А. Имшенецкий, О ядерном аппарате бактерий 65

Н. А. Красильников и А. И. Кореняко. Мицетин и его бактерицидные свойства 80

Е. Н. Мишустин и В. И. Буканова. Об ориентации бактериальных нитей в колонии Bac. mycoides 86

М. В. Федоров. О химизме фиксации азота атмосферы азотобактером. Продуктивность азотфиксации на разных источниках углерода 94

Н. Д. Иерусалимский и А. Д. Булаткин. Влияние ростовых веществ на ацетоно-этиловые бактерии. I. Потребность бактерий в различных витамино-подобных веществах 107

И. П. Захаров и Г. Ф. Назаренко. Применение продуктов автоклавного гидролиза белка для азотистого питания дрожжей и получения сивушного масла . 113

А. А. Ворошилова и Е. В. Дианова. Среды улучшенного развития бактерий с полной и частичной заменой агар-агара 119

Ю. М. Штуцер. О симбиотических отношениях между целлюлозоразлагающими бактериями и азотобактером 129

CONTENTS

A. A. Imšenecki. On the nuclear apparatus of bacteria 79

N. A. Krassilnikov and A. I. Koreniako. Mycetin and its bactericidal properties 85

E. N. Mishustin and V. I. Bukanova. On the orientation of bacterial filaments in Bac. mycoides colonies 92

M. V. Fedorov. On the chemical aspect of the fixation of Atmospheric nitrogen by Azotobacter. The productivity of nitrogen fixation in the presence of various sources of carbon 105

N. D. Jerusalimsky and A. D. Bulatkin. The influence of the growth substances on acetone-ethylic bacteria 1. The need of bacteria in various vitaminlike substances . . . 112

I. P. Zakharov and G. F. Nazarenko. Utilization of the products of autoclave hydrolysis of protein for the nitrogen nutrition of yeasts and the production of fusel oil 118

A. A. Voroshilova and E. V. Dianova. Media improving bacterial growth and totally or partly substituting agar 128

J. M. Stuzer. On the symbiotic relations between cellulose-decomposing bacteria and Azotobacter . . . 136

Ответственный редактор *Б. Л. Исаченко*

Подписано к печати 29.IV. 1945 Объем 4½ печ. л. 7,75 уч.-изд. л. А16700
Тираж 2500 экз. Цена 8 руб. Зак. № 173

2-я типография издательства Академии Наук СССР, Москва, Шубинский, 10

Цена 8 руб.